

Aus Klinik und Institut für physikalische
Medizin und Balneologie der Universität Gießen
in Bad Nauheim

Direktor: Professor Dr. V. R. Ott

Über Veränderungen des Blutserums und lymphatischen Systems bei der Adjuvans- krankheit der Ratte in Abhängigkeit vom Alter

(Chemische und serologische Untersuchungen)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Peter Baumstieger
aus Gießen

Jürgen Pohl
aus Erfurt

Gießen 1973

Aus Klinik und Institut für physikalische
Medizin und Balneologie der Universität Gießen
in Bad Nauheim
Direktor: Professor Dr. V. R. Ott

Über Veränderungen des Blutserums und lymphatischen Systems bei der Adjuvans- krankheit der Ratte in Abhängigkeit vom Alter

(Chemische und serologische Untersuchungen)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Peter Baumstieger
aus Gießen

Jürgen Pohl
aus Erfurt

Gießen 1973



Dekan: Prof. Dr. Hj. Staudinger

Referent: Prof. Dr. V. R. Ott

Korreferent: Prof. Dr. L. Róka

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.0 <u>Einleitung und Fragestellung</u> =====	1
2.0 <u>Material und Methoden</u> =====	6
2.1 <u>Material</u>	6
2.1.1 Versuchstiere	6
2.1.2 Freundsches Adjuvans	6
2.2 <u>Methoden</u>	6
2.2.1 Haltung und Ernährung der Versuchstiere	6
2.2.2 Erzeugung der Adjuvans-Arthritis	7
2.2.3 Aufarbeitung des Materials	7
2.2.3.1 Gelenkmessungen	7
2.2.3.2 Gewichtsbestimmungen	8
2.2.3.3 Obduktion der Tiere	8
2.2.3.4 Chemische Untersuchungen	8
2.2.3.4.1 Bestimmung der Serum-Glutamat- Oxalacetat-Transaminase (SGOT)	8
2.2.3.4.2 Bestimmung der Serum-Glutamat- Pyruvat-Transaminase (SGPT)	9
2.2.3.4.3 Bestimmung der α -Hydroxybutyrat- Dehydrogenase (HBDH)	10
2.2.3.4.4 Bestimmung der Creatinphosphokinase (CPK)	10
2.2.3.4.5 Bestimmung des Serumcalciums	11
2.2.3.4.6 Bestimmung des anorganischen Phosphates im Serum	11
2.2.3.4.7 Bestimmung der alkalischen Phosphatase	11
2.2.3.4.8 Vorbereitung zur Weiterverarbeitung der lymphatischen Organe	13
2.2.3.4.9 Bestimmung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) in lymphatischen Organen	13
2.2.3.4.10 Bestimmung der Ribonucleinsäure (RNS) in lymphatischen Organen	14
2.2.3.4.11 Protein-Bestimmung in lymphatischen Organen	15

2.2.3.5	Serologisch-immunologische Untersuchungen	11
2.2.3.5.1	Papierelektrophorese der Seren	11
2.2.3.5.2.	Untersuchung der Seren auf Rheumatoidfaktoren	11
2.2.3.6	Statistische Untersuchungen	11
3.0	Ergebnisse =====	11
3.1	<u>Gelenkmessungen</u>	11
3.2	<u>Körpergewichte</u>	11
3.3	<u>Chemische Untersuchungen</u>	11
3.3.1	Die Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (SGOT)	11
3.3.2	Die Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (SGPT)	22
3.3.3	Die α -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (HBDH)	22
3.3.4	Die Creatin-Phosphokinase	22
3.3.5	Das Serum-Calcium	22
3.3.6	Das anorganische Phosphat	22
3.3.7	Die alkalische Phosphatase	31
3.3.8	Verhalten der Feuchtgewichte sowie des DNS-, RNS- und Protein-Gehaltes lymphatischer Organe	31
3.3.8.1	Veränderungen im Rahmen der Primärreaktion	31
3.3.8.1.1	Makroskopisch sichtbare Veränderungen am Injektionsort	31
3.3.8.1.2	Feuchtgewichte, DNS-, RNS- und Protein-Gehalt der die Injektionsstelle primär drainierenden <u>inguinalen</u> Lymphknoten	36
3.3.8.1.3	Feuchtgewichte, DNS-, RNS- und Protein-Gehalt der die Injektionsstelle primär drainierenden <u>axillären</u> Lymphknoten	39
3.3.8.2	Veränderungen im Rahmen der Sekundärreaktion	39
3.3.8.2.1	Makroskopisch sichtbare Pfotenveränderungen	39
3.3.8.2.2	Feuchtgewicht, DNS-, RNS- und Protein-Gehalt der die Injektionsstelle nicht drainierenden poplitealen Lymphknoten	41

3.3.8.2.3	Feuchtgewicht, DNS-, RNS- und Protein- Gehalt der Milz	42
3.3.8.2.4	Feuchtgewicht, DNS-, RNS- und Protein- Gehalt des Thymus	44
3.3.9	Papierelektrophorese der Blutseren	46
3.4	<u>Untersuchungen auf Rheumatoidfaktoren</u>	49
4.0	<u>Diskussion</u> =====	50
5.0	<u>Zusammenfassung</u> =====	61
6.0	<u>Literaturverzeichnis</u> =====	63
7.0	<u>Lebensläufe</u> =====	70

1.0 Einleitung und Fragestellung

=====

Bei der Erforschung von Ätiologie und Pathogenese der Erkrankungen des Menschen sind tierexperimentelle Krankheitsmodelle, die die betreffende Erkrankung des Menschen imitieren, von großem Wert. Leider ist es jedoch bisher nur in wenigen Fällen gelungen - von Infektionskrankheiten abgesehen -, für den Menschen typische Krankheitsbilder an Tieren zu erzeugen, die dann auch pathologisch-anatomisch, klinisch und in ihrer therapeutischen Ansprechbarkeit dem analogen menschlichen Leiden entsprechen. Dies gilt in besonderem Maße für Krankheiten, bei denen immunologische Vorgänge in irgendeinem Glied der pathogenetischen Kette eine Rolle spielen, wie das zum Beispiel bei den rheumatischen und pararheumatischen Erkrankungen der Fall ist. Andererseits gibt es jedoch scheinbar spontan auftretende Krankheiten im Tierreich, die zum Teil verblüffende Ähnlichkeit mit Erkrankungen des Menschen zeigen, zum Beispiel die an den menschlichen visceralen Erythematoses erinnernde Aleutenkrankheit der Nerze. Sie wird wahrscheinlich durch ein Virus verursacht.

Für die menschliche rheumatoide Arthritis (primär (progressiv) chronische Polyarthrititis), die mit einer Morbidität von 1 % der Gesamtbevölkerung und wegen der in einem großen Teil der Krankheitsfälle sich entwickelnden Deformierungen und Gelenkzerstörungen von erheblicher sozialer Bedeutung ist, gibt es kein tierexperimentelles Modell, das den charakteristischen Krankheitsverlauf und die spezifischen patho-histologischen Veränderungen in allen Einzelheiten befriedigend nachzuahmen vermag. Insbesondere fehlt fast allen bisher bekannten Modellerkrankungen eine Besonderheit der menschlichen rheumatoiden Arthritis: ihre Chronizität, das "self-perpetuating".

Schon KLINGE, FRICKE und VAUBEL (28, 49) gelang es 1929, anaphylaktische (allergische) Gelenksentzündungen durch artfremdes Serum zu erzeugen. Sie beobachteten neben der artikulären Erkrankung auch eine generalisierte Reaktion, die sich in einer Entzündung der nicht injizierten Gelenke sowie des Bindegewebes anderer Organe manifestierte.

Im Jahre 1954 und 1956 fanden STOERK (47) und PEARSON (34) unabhängig voneinander, daß es bei Ratten nach Injektion von komplettem Freundschens Adjuvans nach einer gewissen Latenzzeit zu eigenartigen Gelenkveränderungen mit Schwellung und Rötung kam. Seit den grundlegenden Untersuchungen von FREUND (16) war die nach ihm benannte Mischung von toten *Tuberkelbakterien* mit Mineralöl vor allem zur Steigerung der Antikörperbildung benutzt worden. Während STOERK und Mitarbeiter ihre Entdeckung nicht verfolgten, erforschten PEARSON und Mitarbeiter dieses experimentelle Arthritismodell in den nächsten Jahren weiter.

Zur Aufhellung von Ätiologie und Pathogenese dieser tierexperimentellen Erkrankung wurden von Anfang an vor allem zwei Hypothesen diskutiert:

1. Die Ansicht, daß die Arthritis die Folge einer Aktivierung eines infektiösen Agens (*PPLO* oder *Streptobacillus moniliformis*) sei. Diese Meinung wurde von PEARSON (35) und von SHARP und WAKSMAN (44) durch umfangreiche Untersuchungen widerlegt.
2. Die Hypothese, bei der Adjuvanserkrankung könne eine "Immunreaktion vom verzögerten Typ", also eine zellvermittelte Immunität, eine wesentliche Rolle spielen. Zahlreiche Befunde, wie zum Beispiel die konstante Latenzzeit, die akzelerierte Antwort bei Reinjektionen, die Resistenz junger Tiere, der inhibitorische Effekt von Röntgenstrahlen und Cortisongaben sowie vor allem die Übertragbarkeit der Erkrankung durch Lymphocyten (35) sprechen für diese Annahme. Die Frage nach dem

Antigen ist allerdings auch heute noch offen. Es wird ein Bestandteil des Tbc-Bakteriums, die "Wachs-D-Fraktion", in Erwägung gezogen. Auch wurde diskutiert, Teile des Bindegewebes veränderten sich durch die Injektion, würden antigen und verursachten dadurch eine immunologische Reaktion. (35)

NEWBOULD (31) und RYZEWSKA (39), BENEKE und Mitarbeiter (3) und NOHL (32) untersuchten die Rolle der Lymphknoten in der Pathogenese der Adjuvanserkrankung. Bei der Beurteilung der Reaktion des lymphatischen Systems nach Injektion von Freundschem Adjuvans muß man allerdings die sogenannte "Primärreaktion" der Erkrankung von der "Sekundärreaktion" deutlich trennen. (BENEKE, NOHL (3))

Unter der Primärreaktion versteht man die äußerlich sichtbaren und histologisch nachweisbaren Veränderungen 1. am Ort der Injektion und 2. an den diese Injektionsstelle drainierenden Lymphknoten. Wählt man als Injektionsstelle eine Hinterpfote, so sind die regionären poplitealen und inguinalen, in gewissem Maß auch die axillären Lymphknoten dieser injizierten Körperseite drainierend und nehmen somit an der Primärreaktion teil. Bei der von uns gewählten Injektion an der dorsalen Schwanzwurzel drainierten die inguinalen und axillären Lymphknoten beider Körperseiten diese Injektionsstelle, die Knielymphknoten beider Seiten drainieren nicht, da sie ja distal von der Injektionsstelle gelegen sind.

Im Gegensatz zur Primärreaktion, die innerhalb von Stunden nach Injektion des F.A. beginnt, ist die Sekundärreaktion der Adjuvans-Erkrankung die eigentliche spezifische Antwort. Sie ist erst nach einer Latenzzeit von 10 - 14 Tagen nachweisbar und umfaßt 1. die immunologisch ausgelöste Polyarthrititis an den nicht injizierten Pfoten, 2. die Reaktion der nicht im Lymphabflußgebiet der Injektionsstelle gelegenen Lymphknoten und 3. die Reaktion in der Milz. Schließ-

lich finden sich als Ausdruck des generalisierten Krankheitsprozesses Veränderungen des Körpergewichtes und eine (stressbedingte) Thymusinvolution.

Das sehr interessante Modell der Adjuvans-Arthritis - wegen der Beteiligung anderer Organe auch als "Adjuvans-Krankheit" bezeichnet - erregte sehr bald auch das Interesse der Pharmakologen, da man an ihm die Wirkungsstärke neu entwickelter Antiphlogistika testen kann. Als Kriterium der Medikamentenwirksamkeit wird am häufigsten der Rückgang der Pfotenschwellungen angesehen.

Die Adjuvans-Erkrankung läßt sich aber auch nachweisen, wenn eine klinisch sichtbare Arthritis fehlt. Als besonders feine Parameter erwiesen sich dafür die cytophotometrisch durchgeführte DNS-Analyse der synovialen Deckzellen an Häutenpräparaten der Kniegelenkskapseln sowie chemische Bestimmungen der DNS, RNS und des Gesamtproteins in den Lymphknoten (BENEKE, NOHL (3)).

Während morphologische und immunologische Kriterien schon oft und eingehend untersucht wurden, hat man chemische Größen im Blutserum bei der Adjuvans-Arthritis bisher selten bestimmt.

Solche chemische Parameter waren das Hauptziel der vorliegenden Untersuchung. Dabei sollte auch eine mögliche Altersabhängigkeit geprüft werden. Weiterhin war zu klären, inwieweit mögliche biochemische Veränderungen - neben den schon bekannten Arthritis-Kriterien - als Maß für die Schwere der Krankheit brauchbar sind.

Im ersten Teil der Arbeit versuchte J. POHL folgende Fragen zu beantworten:

1. Finden sich bei den an der Adjuvans-Krankheit leidenden Tieren Veränderungen der Aktivitäten der SGOT, SGPT, HBDH und CPK im Blutserum und erlauben es eventuelle Veränderungen dieser Enzymaktivitäten, Schäden an bestimmten Organen anzunehmen?
2. Finden die schon früh einsetzenden Knochenneu- und -umbildungsvorgänge ihren Niederschlag in Veränderungen von Ca, P und der alkalischen Phosphatase im Serum?
3. Ergibt sich für die unter 1. - 2. aufgeführten Befunde ein Hinweis auf eine Altersabhängigkeit bei kranken und gesunden Tieren?

Im zweiten Teil der Arbeit untersuchte P. BAUMSTIEGER durch DNS-, RNS- und Proteinbestimmungen die Stärke der Mitreaktion in den axillären, inguinalen und poplitealen Lymphknoten und stellte diese in Beziehung zur Entfernung zwischen Injektionsort und Lymphknoten. Daraus ergaben sich folgende weitere Fragen:

4. Wie stark ist - gemessen am chemisch bestimmten DNS-, RNS- und Proteingehalt von axillären, inguinalen und poplitealen Lymphknoten - die Mitreaktion der Lymphknoten in dem hier gewählten Arthritismodell?
5. Ist die Intensität der Lymphknotenreaktion im vorliegenden Arthritismodell orts- und altersabhängig?
6. Wie verhalten sich die elektrophoretisch bestimmten Serumweißfraktionen bei kranken und gesunden Tieren? Ergibt sich ein Hinweis auf eine Altersabhängigkeit bei kranken und gesunden Tieren?
7. Sind mit einem Latex-Test Rheumatoidfaktoren nachweisbar?

2.0 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 113 männliche SIV-50-Ratten der Firma Ivanovas/Kisslegg im Allgäu verwendet. Um eine Altersabhängigkeit der untersuchten Größen erkennen zu können, verwendeten wir Tiere dreier Altersgruppen.

Die Gruppe I mit 40 Tieren war zu Versuchsbeginn 4 Wochen alt, die Gruppe II mit 48 Tieren 3 Monate, und die Gruppe III mit 25 Tieren 7 Monate alt (pro Gruppe Versuchs- und Kontrolltiere zusammengekommen).

2.1.2 Freundsches Adjuvans

Wir benutzten komplettes Freundsches Adjuvans der Firma Difco Laboratories Detroit, USA. 10 ml des kompletten Freundschen Adjuvans bestehen aus 1,5 ml Arlacel A (= Mannit-monooleat) und 8,5 ml Bayol F (= 42,5 % Paraffin, 31,4 % monozyklisches Naphthalin, 26,1 % polyzyklisches Naphthalin) sowie 5 mg hitzegetötete Mycobakterien (*Mycobacterium butyricum*). Diesem Freundschen Adjuvans wurden zusätzlich Mycobakterien (*Mycobacterium butyricum*) der gleichen Firma in unterschiedlicher Menge zugegeben (siehe 2.2.2).

2.2 Methoden

2.2.1 Haltung und Ernährung der Versuchstiere

Die Ratten wurden in einem gut belüfteten Tierstall in Käfigen mit jeweils 2 - 4 Tieren gehalten. Die Ernährung setzte sich aus Altromin^R-Standardfutter und Wasser ad libitum zusammen.

2.2.2 Erzeugung der Adjuvans-Arthritis

Um eine generalisierte Adjuvanserkrankung mit deutlicher sekundärer Gelenkbeteiligung zu erhalten, wählten wir als Ort der Injektion die dorsale Schwanzwurzel. Es wurde darauf geachtet, daß die Tiere wegen ihrer unterschiedlichen Körpergewichte eine möglichst ähnliche Menge an Mycobakterien pro kg Körpergewicht erhielten. Nach kurzer Eingewöhnung der Tiere injizierten wir deshalb folgende Mengen:

1. Die vier Wochen alten Tiere der Gruppe I bekamen 0,1 ml einer Mischung von 10 ml inkomplettem Freundschens Adjuvans, dem 15 mg Mycobakterien zugesetzt worden waren.
2. Die 3 Monate alten Tiere der Gruppe II erhielten 0,1 ml mit einer Mischung von 100 mg Mycobakterien in 10 ml inkomplettem Freundschens Adjuvans.
3. Die 7 Monate alten Tiere der Gruppe III bekamen 0,15 ml der gleichen Mischung in die Schwanzwurzel injiziert.

Die injizierte Menge an Mycobakterien verteilte sich demnach wie folgt:

Die Gruppe I hatte 3,3 mg/kg Körpergewicht erhalten, die Gruppe II 3,1 mg/kg Körpergewicht und die Gruppe III 3,5 mg/kg.

2.2.3 Aufarbeitung des Materials

2.2.3.1 Gelenkmessungen

Bei allen Tieren wurde am Versuchsbeginn und Versuchsende die Dicke der Vorder- und Hinterpfoten in Höhe der Vorderpfotenwurzel bzw. der Malleolengabel mit einer Schublehre gemessen.

2.2.3.2 Gewichtsbestimmungen

Von allen Versuchs- und Kontrolltieren wurde am Versuchsbeginn und Versuchsende das Körpergewicht ermittelt und für die Untersuchung ausgewertet.

2.2.3.3 Obduktion der Tiere

24 - 25 Tage nach Injektion des Freundschens Adjuvans wurden die Tiere getötet. In Äthernarkose wurden Haut und subkutanes Binde- und Fettgewebe auf der Bauchseite in der Mittellinie vom Unterkiefer bis zur Symphyse gespalten. Die Bauchhöhle wurde eröffnet und das Tier durch Blutentnahme aus der Aorta getötet. Das gewonnene Blut wurde für die Serumbestimmungen zentrifugiert; wenn das Serum, wie in wenigen Fällen, hämolytisch war, wurde es verworfen. Die Fermentuntersuchungen wurden sofort durchgeführt; für die übrigen Bestimmungen wurden die Seren eingefroren und in den nächsten Tagen weiterverarbeitet.

2.2.3.4 Chemische Untersuchungen

Für die Bestimmung der SGOT und der SGPT verwendeten wir die UV-Teste der Firma Merck, Darmstadt. Für die α -HBDH, das anorganische Phosphat und die alkalische Phosphatase wurden die Reagentiensätze der gleichen Firma nach den standardisierten Arbeitsvorschriften benutzt. Die CPK wurde mit der Biochemica-Test-Combination der Firma Boehringer, Mannheim, bestimmt.

Alle Untersuchungen wurden mit dem Spektralphotometer der Firma Zeiss, Oberkochen, durchgeführt.

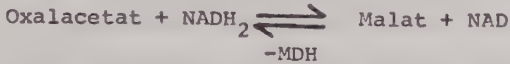
2.2.3.4.1 Bestimmung der Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (SGOT)

Die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, die in Muskelzellen, Erythrocyten und geringgradig in vielen anderen Körperzellen, vor allem aber in den Mitochondrien der Leberzellen

vorkommt, katalysiert folgende Reaktion:



Letzteres wird enzymatisch in Gegenwart von Malatdehydrogenase mit NADH_2 zu Malat umgesetzt:



Die NADH_2 -Abnahme wird photometrisch 3 Minuten lang bei 366 nm gemessen. Es werden 0,5 ml Serum benötigt. Der Normalbereich beim Menschen beträgt 2 - 19 mU/ml.

2.2.3.4.2 Bestimmung der Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (SGPT)

Die Glutamat-Pyruvat-Transaminase zeigt ein der SGOT ähnliches Verteilungsmuster, kommt jedoch nicht in Erythrocyten vor. Sie katalysiert die Übertragung des Stickstoffs von Glutamat auf Pyruvat:



Das Pyruvat wird enzymatisch von LDH durch NADH_2 zu Lactat umgesetzt:



Die NADH_2 -Abnahme wird 5 Minuten lang photometrisch gemessen; es handelt sich bei diesem Test also wie bei der Bestimmung der SGOT um eine gekoppelte Reaktion. Benutzt wurde der Reagensiensatz mit optimaler Substratkonzentration, der genauere Ergebnisse als der normale UV-Test vermitteln soll. Benötigt werden auch hierfür 0,5 ml Serum. Beim Menschen beträgt der Normalwert 5 - 24 mU/ml.

2.2.3.4.3 Bestimmung der α -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (HBDH)

Die α -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase entspricht weitgehend der myokardtypischen LDH-Isoenzymfraktion LDH₁, sie kommt außer in Herzmuskelzellen in geringeren Konzentrationen auch in Leberzellen, Pankreas und Lunge vor. Sie katalysiert die Reduktion von α -Ketobuttersäure mit NADH₂:



Der NADH₂-Verbrauch wird photometrisch 5 Minuten lang bei 366 nm gemessen und aus der Extinktionsabnahme die Enzymaktivität berechnet. Es werden 0,1 ml Serum benötigt. Beim Menschen liegen die Normalwerte zwischen 55 und 140 mU/ml.

2.2.3.4.4 Bestimmung der Creatinphosphokinase (CPK)

Die Creatinphosphokinase ist weitgehend organspezifisch für Herz- und Skelettmuskulatur und katalysiert die reversible Phosphorylierung von Creatin durch ATP:



Wir verwendeten die Reagentien der Firma Boehringer "CPK-aktiviert", mit denen die "Rückwärtsreaktion" bei pH 7 gemessen wird, die wesentlich schneller verläuft und deswegen Normalwerte bis 50 mU/ml beim Menschen aufweist. Die Reaktion verläuft weiter:



(6-PG = 6-Phosphogluconat)

(G-6-PDH = Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase)

Um die rasch eintretende Inaktivierung durch Oxydation im aktiven Zentrum des Enzyms rückgängig zu machen, wird in diesem Test reduziertes Glutathion zugegeben, so daß die Bestimmungen nicht sofort nach Blutentnahme, wie bei älteren Tests, ausgeführt werden müssen.

2.2.3.4.5 Bestimmung des Serumcalciums

Der Calcium-Gehalt im Serum wurde mit dem Flammenphotometer PF 5 der Firma Leitz, Wetzlar, nach den Vorschriften der Betriebsanleitung bestimmt. Im Serum erwachsener Menschen beträgt der Calcium-Gehalt 4,3 - 5,8 mVal/l.

2.2.3.4.6 Bestimmung des anorganischen Phosphates im Serum

Zur Bestimmung des anorganischen Phosphates werden 0,1 ml Serum benötigt, dessen Phosphat mit Natriummolybdat zu Phosphormolybdat vereinigt sind. Dieses wird durch Reduktion in kolloidales Molybdänblau überführt, welches photometrisch bei 578 nm bestimmt werden kann. Die Normalwerte im Serum erwachsener Menschen betragen 2,5 bis 4,8 mg/100 ml, bei Kindern 4 bis 7 mg/100 ml.

2.2.3.4.7 Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Die alkalischen Phosphatase kommt in den Leberzellen und Osteoblasten vor. Zu ihrer Bestimmung läßt man sie auf das Substrat p-Nitrophenylphosphat einwirken, das in p-Nitrophenolat und Phosphat gespalten wird. Aus der Extinktionsänderung, gemessen während 3 Minuten bei 405 nm im Photometer, wird die Aktivität der alkalischen Phosphatase berechnet. Mit dieser Methode ergeben sich für den Menschen Normalwerte von 60 bis 200 mU/ml,

2.2.3.4.8 Vorbereitung zur Weiterverarbeitung der lymphatischen Organe (Perchlorsäurehydrolyse)

Nach dem Wiegen wurden die Lymphknoten der jeweiligen Lymphknotenstationen sowie Milz und Thymus sofort weiterverarbeitet. Das Gewebe der einzelnen Organe wurde mit einem Glasstab in ca. 4 ml eisgekühlter 0,25 m HClO_4 zu einem groben Gewebsbrei zerquetscht. Dabei achteten wir peinlich darauf, daß keine Gewebspartikel verloren gingen. Der Brei wurde nun ca. 10 min in gekühlter Zentrifuge mit 3000 U/min geschleudert. Der Überstand mit herausgewaschenen Blutbestandteilen und Fettgewebe wurde verworfen. Bei Milz und Thymus wiederholten wir diesen Waschvorgang zweimal.

Das Sediment füllten wir mit 0,5 m HClO_4 auf (und zwar Milz und Thymus mit 4 ml, die Lymphknoten mit 2 ml). Waren alle Proben bis zu diesem Punkt verarbeitet, wurde das Sediment aufgerührt und im Wasserbad bei 90°C 40 min lang hydrolysiert. Nach Abkühlen und Schleudern mit 3000 U/min ca. 15 min lang schütteten wir den Überstand sorgfältig ab und füllten ihn mit 0,5 m HClO_4 auf 5 ml (Milz und Thymus) und 3 ml (Lymphknoten) auf. Dieser Überstand wurde zur Bestimmung der DNS und RNS weiterverarbeitet. Das Sediment wurde für die Proteinbestimmung in 0,2 m NaOH bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

2.2.3.4.9 Bestimmung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) in lymphatischen Organen nach BURTON 1955 (7)

a) Makromethode für relativ große Einwaagen

Reagentien:

DNS-Standard-Lösung: 100 mg niedermolekulare DNS
werden in 100 ml 0,5 m HClO_4
20 min bei 70°C hydrolysiert.
Gehalt an DNS: 1 mg/ml

DNS-Reagens: 1,5 g Diphenylamin / 1000 ml Eisessig
+ 1,5 ml konzentrierte Schwefelsäure

1 ml des mit 0.5 m HClO_4 verdünnten Überstandes wurde mit 3,0 ml DNS-Reagens versetzt. Die Reaktion lief 15 min bei 90°C .

Nach Abkühlen im Dunkeln maßen wir die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 578 nm (Hg-Lampe im Spektralphotometer der Fa. Zeiss, Oberkochen). Aus der Eichkurve der Standardverdünnungsreihe wurden die DNS-Werte pro 1,0 ml Überstand abgelesen. Mit 5 multipliziert ergaben sie den DNS-Gehalt im gesamten Überstand und damit den DNS-Gehalt der eingewogenen Gewebsmenge.

b) Mikromethode für kleine Einwaagen

Um bei sehr kleinen Einwaagen noch genaue Werte zu erhalten, verwendeten wir für die DNS-Bestimmung die Mikromethode nach BURTON. Ein Drittel des auf 3 ml aufgefüllten Hydrolysates wurde zunächst mit 0,5 m HClO_4 weiterverdünnt nach Tabelle 1.

Tab. 1 Verdünnung des Perchlorsäurehydrolysates für die DNS-Bestimmung bei kleinen Gewebseinwaagen

Einwaage (Feuchtgewicht)			Verdünnung in Teilen Hydrolysat 0.5m HClO_4			Verdünnung in ml Hydrolysat 0.5m HClO_4		
0	-	10 mg	1	+	1	0,5	+	0,5
11	-	30 mg	1	+	4	0,2	+	0,8
31	-	50 mg	1	+	9	0,1	+	0,9
51	-	80 mg	1	+	12	0,1	+	1,2
81	-	130 mg	1	+	15	0,1	+	1,5
über		130 mg	1	+	19	0,1	+	1,9

Reagentien:

DNS-Standard-Lösung: 10 mg DNS/10 ml 0.5 m HClO_4 wurden bei 70°C 15 min hydrolysiert und anschließend 1:10 verdünnt.

Gehalt an DNS: 100 μg / ml

DNS-Reagens:

Lösung A: 1,5 g Diphenylamin in 100 ml Eisessig
+ 1,5 ml konzentrierte Schwefelsäure

Lösung B: 2,5 ml aqua dest. + 50 Mikroliter Acetaldehyd

Die Lösung wurde jeweils frisch hergestellt. Vor Gebrauch mischten wir die Lösungen A und B im Verhältnis 1:5.

1 ml des verdünnten Hydrolysates wurde mit 2 ml DNS-Reagens versetzt und zusammen mit einer Verdünnungsreihe der Standard-Lösung für 17 Std. bei Zimmertemperatur in abgedunkeltem Raum stengelassen. Danach maßen wir bei 578 nm die Verdünnungsreihe und die Proben. Aus der Eichkurve wurde der DNS-Gehalt der Gewebprobe abgelesen und der Gehalt des Gesamtorganes sowie die DNS-Konzentration pro 100 mg Organfeuchtgewicht errechnet.

2.2.3.4.10 Bestimmung der Ribonucleinsäure (RNS) in lymphatischen Organen (nach CERIOTTI 1955 (8))

Die RNS-Bestimmung wurde nach der Methode von CERIOTTI 1955 (8) durchgeführt,

Reagentien:

RNS-Standardlösung: 5 mg D-Ribose / 100 ml 0.5 m HClO_4

RNS-Reagens: 0,1 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ / 100 ml
25%iger HCL + 3,5 ml 6%iger
Orcin-Äthanol-Lösung

Nach der Perchlorsäurehydrolyse wurde mit 1 ml des Überstandes wieder eine abgestufte Verdünnung mit 0.5 m HClO_4 durchgeführt, um die durch die großen Unterschiede des Organgewichtes zu erwartenden Extinktionsstreuungen auszugleichen (siehe Tabelle 2).

Tab. 2: Verdünnung des Perchlorsäurehydrolysates für die RNS-Bestimmung bei kleinen Gewebseinwaagen

Einwaage (Feuchtgewicht)	Verdünnung in Teilen		Verdünnung in ml	
	Hydrolysat	0.5 m HClO ₄	Hydrol.	0.5 m HClO ₄
0 - 30 mg		unverdünnt	1	+ 0
31 - 60 mg	1	+ 2	0,5	+ 1,0
61 - 70 mg	1	+ 3	0,5	+ 1,5
71 - 80 mg	1	+ 4	0,2	+ 0,8
81 - 100 mg	1	+ 5	0,2	+ 1,0
101 - 130 mg	1	+ 6	0,2	+ 1,2
131 - 170 mg	1	+ 9	0,1	+ 0,9
über 170 mg	1	+ 9	0,1	+ 0,9

1 ml der verdünnten Lösung wurde mit 3 ml RNS-Reagens versetzt. Die Reaktion der Standardverdünnungsreihe und der Proben lief 40 min bei 90°C, nach Abkühlen maßen wir die Extinktion mit dem Photometer bei 644 nm (Cd-Lampe). Die Resultate wurden mit den Werten der Eichkurve verglichen und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um den Ribose-Gehalt des gesamten Überstandes zu ermitteln. Da aber in der Standard-Lösung Ribose und nicht RNS verwendet wurde, multiplizierten wir die Werte noch mit dem Faktor 3,851 (Umrechnungsfaktor nach BENEKE, unveröff. Arbeit).

2.2.3.4.11 Protein-Bestimmung in lymphatischen Organen (nach LOWRY und Mitarbeiter 1951)

Die Proteinbestimmung erfolgte mit der Folinreaktion nach der Methode von LOWRY und Mitarbeiter (29).

Protein-Standard-Lösung: 10 mg Rinder-Serum-Albumin
/ 50 ml 0.5 NaOH
Gehalt an Albumin: 200 µg/ml

Protein-Konzentration: 1. Lösung A 2,68 g K-Na-Farctat
100 ml aqua dest.

Lösung B 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ /
100 ml aqua dest.

Lösung C 4 g NaOH + 20 g Na_2CO_3 /
100 ml aqua dest.

Vor Gebrauch mischen:

1 ml der Lösung A
+ 1 ml der Lösung B
+ 100 ml der Lösung C

2. Folin-Ciocalteus-Phenolreagens

Das Sediment der HClO_4 -Hydrolyse wurde in einem Meßkolben mit 0,5 M NaOH auf 50 ml aufgefüllt und für 24 Std. bei 37°C hydrolysiert. Das danach völlig gelöste Sediment wurde weiterverdünnt (siehe Tabelle 3).

Tab. 3: Verdünnung des Perchlorsäurehydrolysates für die Protein-Bestimmung bei kleinen Gewebsinwaagen

Einwaage (Feuchtwicht)		Verdünnung in Teilen Hydrolysat	Verdünnung in ml Hydrol. 0,5 M HClO_4
0	-	40 mg	unverdünntes Hydrol.
41	-	60 mg	1 + 1
61	-	90 mg	1 + 2
91	-	120 mg	1 + 4
121	-	150 mg	1 + 6
151	-	180 mg	1 + 8
181	-	220 mg	1 + 9

Zu 1 ml der verdünnten Lösung wurden 4 ml Protein-Reagens gegeben. Die Reaktion lief in der Standardverdünnungsreihe und den Proben 1 Std. bei Zimmertemperatur im Dunkeln. Nach Zugabe von 0,5 ml von 1:1 mit aqua dest. verdünntem Folin-Ciocalteus-Phenolreagens und einer Reaktionszeit von 1 1/2 Std. bei Zimmertemperatur im Dunkeln wurde die Extinktion bei 772 nm (Hg-Lampe) gemessen. Dieser Extinktionswert lieferte nach Berücksichtigung der Verdünnung im Vergleich mit der Eichkurve den Gehalt des Sedimentes und damit den Proteingehalt der Einwaage.

2.2.3.5 Serologisch-immunologische Untersuchungen

2.2.3.5.1 Papierelektrophorese des Blutserums

Das aus dem Blut der Bauchorta gewonnene Serum wurde mit der Papierelektrophorese nach der Methode von GRASSMANN und HANNIG (21) aufgetrennt. Der pH des Veronalpuffers betrug 8,6, die Laufzeit 14 - 16 Std. Die getrennten Eiweißfraktionen wurden angefärbt und mit einem Integralschreiber graphisch dargestellt.

2.2.3.5.2 Untersuchung der Seren auf "Rheumatoid-faktoren"

Die Seren aller Ratten wurden mit dem Latex-RF-Reagens der Behring-Werke Marburg auf das Vorhandensein von Rheumatoid-faktoren untersucht. Wir mischten einen Tropfen des mit Glycin-NaCl-Puffer im Verhältnis 1:20 verdünnten Rattenserums mit einem Tropfen des Latex-RF-Reagens (wässrige Suspension von Polystyrol-Latex-Partikeln, die mit Human- γ -Globulin beladen sind). Nach 3 Minuten wurde auf Agglutination geprüft.

2.2.3.6 Statistische Untersuchungen

Mit Hilfe eines Rechenprogramms wurden der DNS-, RNS- und Proteingehalt der untersuchten Organe aus den gemessenen Extinktionen pro 100 mg Feuchtgewicht und pro Gesamtorgan

direkt errechnet. Von diesen und allen anderen Einzelwerten eines Kollektivs wurden das arithmetische Mittel sowie die Streuung der Mittelwerte nach der Formel

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n - 1}}$$

bestimmt.

Die Prüfung auf Signifikanz der Mittelwertsunterschiede erfolgte mit dem t-Test für unverbundene oder verbundene Stichproben. Es wurden die Tischrechner Diehl-Sigmatron und Olivetti Programma 101 sowie die wissenschaftlichen Tabellen der Fa. Geigy verwendet (9).

Die Anzahl der Einzelwerte (n) war nicht in allen Versuchen bei Versuchs- und Kontrolltieren die gleiche, da gelegentlich nicht genügend Blut gewonnen werden konnte, chemische Analysen mißglückten oder nicht durchführbar waren (haemolytische Seren!) oder Lymphknoten nicht auffindbar waren.

3.0 Ergebnisse

3.1 Gelenkmessungen

Nur bei den 3 Monate alten Versuchstieren waren am Versuchsende, also 3 1/2 Wochen nach Injektion des Freundschens Adjuvans, die Pfoten signifikant dicker als bei den gesunden Kontrolltieren (Tab. 4). Die 4 Wochen alten Tiere zeigten eine wachstumsbedingte Pfotenvergrößerung, die jedoch bei Versuchs- und Kontrolltieren in gleichem Maße vorhanden war. Bei den ausgewachsenen 7 Monate alten Tieren waren charakteristische Veränderungen nicht erkennbar. Bezüglich der Häufigkeit der Arthritis und der Beschreibung dieser Primärreaktion siehe Kapitel 3.3.8.2.1

3.2 Körpergewichte

Die Versuchstiere der Gruppen I und II (1 und 3 Monate alte Tiere) waren zu Versuchsende signifikant leichter als die jeweils entsprechenden Kontrolltiere ($p < 0,01$ bzw. $< 0,0125$). Sie zeigten also während des Versuches eine deutliche Ver-
minderung der zu erwartenden physiologischen Gewichtszu-
nahme (bei der Gruppe I um 9 %, bei der Gruppe II um 8 %). Die Gruppe III wies keinen signifikanten Unterschied in der Gewichtsentwicklung auf (Tab. 5).

3.3 Chemische Untersuchungen

3.3.1 Die Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (SGOT)

Die Untersuchungsbefunde der SGOT sind in der Tabelle 6 zusammengestellt. Die Enzymaktivitäten steigen bei den gesunden Tieren mit zunehmendem Lebensalter an; zwischen den Tieren der ersten und zweiten sowie zwischen den Tieren der ersten und dritten Altersgruppe besteht in den Werten ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Die Tiere der zweiten und dritten Gruppe unterscheiden sich jedoch nicht signifikant voneinander.

Tabelle 4

Durchmesser der Hinterpfoten von Ratten bei Adjuvanskrankheit 24 - 25 Tage nach Injektion von Freundschem Adjuvans im Vergleich mit gesunden Tieren

<u>Mittelwerte der Pfotendurchmesser in mm</u>						
		Versuchsbeginn		Versuchsende		n
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	
Gruppe I	1 Monat alte Kontrolltiere	5,7	0,29	6,45	0,32	20
	Versuchstiere	5,36	0,32	6,13	0,28	24
Gruppe II	3 Monate alte Kontrolltiere	6,81	0,30	6,99	0,53	20
	Versuchstiere	6,81	0,33	7,32	0,95	24
Gruppe III	7 Monate alte Kontrolltiere	7,08	0,45	7,10	0,25	22
	Versuchstiere	7,34	0,35	7,30	0,73	26

n=Anzahl der Hinterpfoten

n/2=Anzahl der Versuchstiere

Tabelle 5

Körpergewichte von Ratten bei Adjuvanskrankheit 24 - 25 Tage nach Injektion von Freundschem Adjuvans im Vergleich mit gesunden Tieren

Mittleres Körpergewicht in Gramm

		Versuchsbeginn		Versuchsende		n
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	
Gruppe I	1 Monat alte					
	Kontrolltiere	65,18	3,22	233,64	19,12	11
	Versuchstiere	60,45	3,50	212,73	15,55	11
Gruppe II	3 Monate alte					
	Kontrolltiere	333,75	8,82	409,58	17,12	12
	Versuchstiere	339,17	9,49	377,08	45,00	12
Gruppe III	7 Monate alte					
	Kontrolltiere	445,00	22,8	475,00	38,47	11
	Versuchstiere	449,58	20,83	472,92	31,44	12

Ebenso wie bei den gesunden Tieren steigen die Enzymaktivitäten auch bei den kranken Tieren mit dem Lebensalter an. Die Werte der Tiere der Altersgruppen I und II, I und III und auch II und III unterscheiden sich mit einer Signifikanz von jeweils $p < 0,05$.

Die Enzymaktivitäten liegen in allen drei Gruppen bei den kranken Tieren über denen der gesunden. Nur bei den ältesten, 7 Monate alten Tieren ist jedoch der Unterschied statistisch signifikant ($p < 0,01$) (Tabelle 6).

3.3.2 Die Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (SGPT)

Die Aktivitäten der SGPT liegen in allen drei Altersgruppen niedriger als die der SGOT. Bei den gesunden Tieren zeichnet sich eine Tendenz zu ansteigenden Aktivitäten mit zunehmendem Lebensalter ab (siehe Abb. 1). Die SGPT-Werte der Altersgruppe II liegen mit einer Signifikanz von $p < 0,0025$ höher als die Werte der Gruppe I; die Werte der Gruppe III sind mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ höher als die Werte der Gruppe I. Die Enzymaktivitäten der Gruppen II und III unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die höchsten SGPT-Werte besitzen die 3 Monate alten Tiere.

Die kranken Tiere zeigen einen nur leichten, nicht signifikanten Anstieg der SGPT-Aktivitäten mit zunehmendem Lebensalter. Genaue Zahlenangaben sind aus Tab. 7 ersichtlich.

Die 4 Wochen und die 7 Monate alten Versuchstiere mit Adjuvanskrankheit haben höhere SGPT-Werte als die entsprechenden Kontrolltiere ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$), während es sich bei den 3 Monate alten Tieren umgekehrt verhält (keine Signifikanz).

3.3.3 Die α -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (HBDH)

Die HBDH-Aktivitäten zeigen noch deutlicher als die der SGOT eine Zunahme mit steigendem Lebensalter. Die Werte unserer Kontrolltiere liegen bei den 3 Monate alten Tieren

Tabelle 6

Aktivitäten der Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (SGOT) bei Adjuvanskrankheit von Ratten verschiedenen Lebensalters

		Mittelwerte der SGOT in mU/ml			
		n	$\bar{x}$	s	p
Gruppe I	1 Monat alte Kontrolltiere	11	31,79	6,05	< 0,10
	Versuchstiere	11	36,91	6,11	
Gruppe II	3 Monate alte Kontrolltiere	11	36,45	5,84	> 0,05
	Versuchstiere	11	46,33	16,37	
Gruppe III	7 Monate alte Kontrolltiere	10	40,9	8,86	< 0,01
	Versuchstiere	10	63,8	21,68	

Tabelle 7

Aktivitäten der Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (SGPT)
bei Adjuvanskrankheit von Ratten verschiedenen Lebensalters

	<u>Mittelwerte der SGPT in mU/ml</u>			
	n	$\bar{x}$	s	p
Gruppe I				
1 Monat alte Kontrolltiere	11	15,7	4,8	< 0,05
Versuchstiere	11	20,51	5,57	
Gruppe II				
3 Monate alte Kontrolltiere	11	23,19	5,17	> 0,05
Versuchstiere	11	21,43	2,45	
Gruppe III				
7 Monate alte Kontrolltiere	11	19,04	3,77	< 0,01
Versuchstiere	11	23,75	3,4	

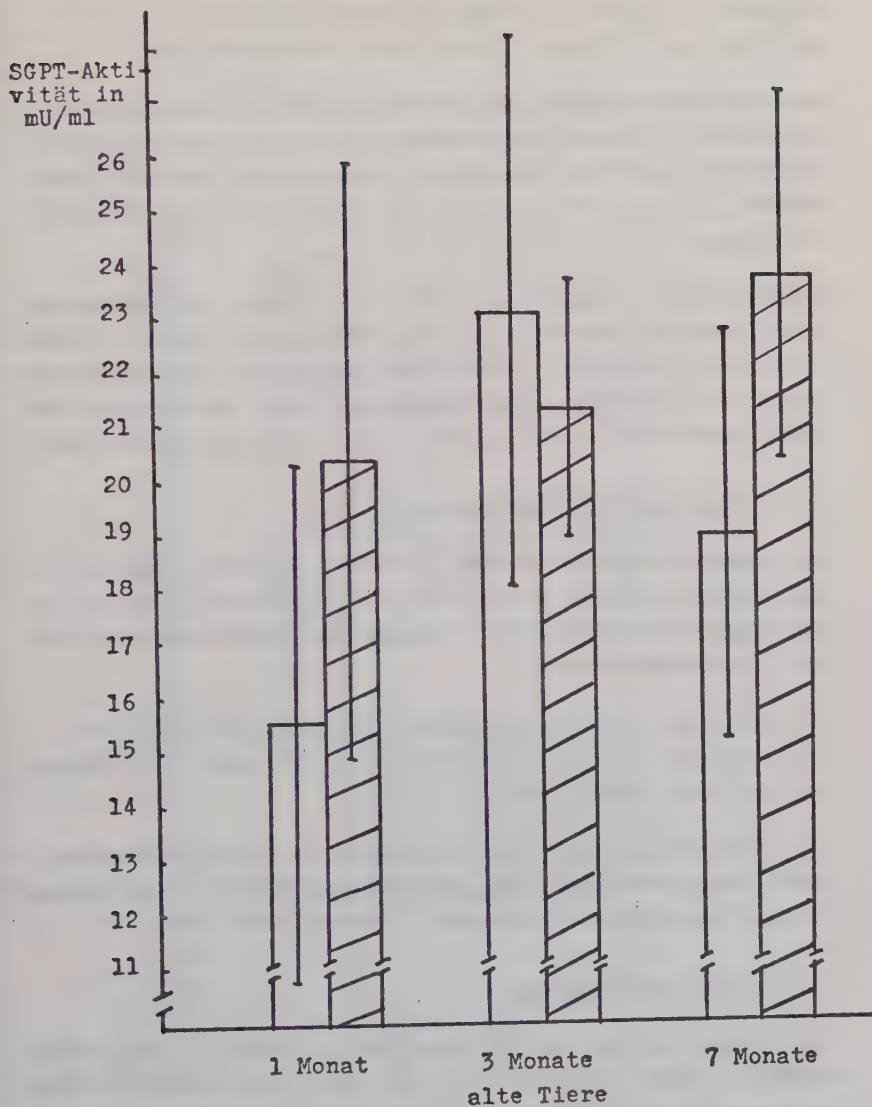


Abbildung 1

Aktivität der Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (SGPT) bei Ratten verschiedenen Lebensalters ohne und mit Adjuvanserkrankung.



=Kontrolltiere



=Versuchstiere

(Gruppe III) beim 2,7fachen der Werte der Gruppe I, also der jüngsten, 4 Wochen alten Tiere (siehe Tab. 8).

Diese Anstiegstendenz der HBDH-Aktivität mit zunehmendem Lebensalter ist bei den an einer Adjuvanserkrankung leidenden Tieren noch viel deutlicher. Hier liegen die Werte der Gruppe II beim 2,2fachen, die der Gruppe III beim 3,2fachen der Gruppe I.

Die Werte der Versuchs- und der Kontrolltiere unterscheiden sich innerhalb der Gruppe I kaum voneinander, in den Gruppen II und III liegt die HBDH bei den Tieren mit Adjuvanserkrankung deutlich höher. Diese Ergebnisse sind jedoch wegen der auffallend hohen Streuung der Enzymwerte nicht signifikant.

3.3.4 Die Creatin-Phosphokinase (CPK)

Die Kontrolltiere der Gruppe II weisen nur etwa halb so hohe CPK-Aktivitäten wie die Kontrolltiere der Gruppe I auf. Sehr junge Tiere haben also viel höhere Serum-CPK-Aktivitäten als ausgewachsene.

Die Werte der Tiere mit Adjuvanserkrankung unterscheiden sich in beiden Altersstufen nur wenig von denen der gesunden Kontrolltiere (siehe Tab. 9).

Die Unterschiede der Enzymaktivitäten zwischen den Gruppen I und II sind sowohl bei den gesunden als auch bei den kranken Tieren statistisch signifikant (jeweils $p < 0,005$).

3.3.5 Das Serum-Calcium

Die 3 Monate alten Kontrolltiere weisen jeweils signifikant höhere Serum-Calcium-Werte auf als die 1 und 7 Monate alten gesunden Tiere. Die ältesten Tiere besitzen die niedrigsten Werte. Die Zahlenwerte sind in Tab. 10 zusammengestellt.

Tabelle 8

Aktivität der α -Hydroxy-Butyrat-Dehydrogenase (HBDH) bei Ratten verschiedenen Lebensalters mit Adjuvanserkrankung, verglichen mit gesunden Kontrollen

Mittelwerte der α -HBDH in mU/ml					
	n	$\bar{x}$	s		p
Gruppe I	1 Monat alte Kontrolltiere	118,26	41,01	> 0,05	
	Versuchstiere	117,2	48,25		
Gruppe II	3 Monate alte Kontrolltiere	158,82	87,15	> 0,10	
	Versuchstiere	263,33	158,46		
Gruppe III	7 Monate alte Kontrolltiere	319,82	98,06	> 0,05	
	Versuchstiere	380,25	227,77		

Tabelle 9

Aktivität der Creatinphosphokinase (CPK) bei Ratten verschiedenen Lebensalters mit Adjuvanserkrankung, verglichen mit gesunden Kontrollen

<u>Mittelwerte der CPK in mU/ml</u>				
	n	$\bar{x}$	s	p
Gruppe I				
1 Monat alte Kontrolltiere	8	125,75	46,56	> 0,05
Versuchstiere	9	123,76	36,98	
Gruppe II				
3 Monate alte Kontrolltiere	8	70,13	14,91	> 0,05
Versuchstiere	12	61,0	30,0	

Die an Adjuvanserkrankung leidenden Tiere zeigen das gleiche Verhalten. Auch bei ihnen haben die 3 Monate alten die höchsten, die 7 Monate alten die niedrigsten Calcium-Werte. Die Unterschiede der jüngsten und ältesten Tiere gegenüber den 3 Monate alten Tieren sind statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Die gesunden Tiere weisen bei den 1- und 7monatigen etwas niedrigere, bei den 3monatigen leicht höhere Calciumspiegel auf als die Ratten mit Adjuvanserkrankung. Insgesamt bewirkt die Adjuvanskrankheit jedoch keine statistisch signifikanten Änderungen des Calciumspiegels im Serum.

3.3.6 Das anorganische Phosphat

Von den gesunden Ratten der 3 Altersgruppen weisen die jüngsten Tiere die höchsten Phosphat-Konzentrationen im Serum auf. Die Werte der 3 und 7 Monate alten Tiere liegen signifikant (jeweils $p < 0,0005$) niedriger als die der 4 Wochen alten. Die Werte der 3 Monate alten Ratten liegen am niedrigsten.

Auch die an Adjuvanserkrankung leidenden Tiere zeigen eine Abnahme der Phosphat-Werte mit zunehmendem Lebensalter. Die Werte der Tiere der Gruppen II und III liegen statistisch signifikant ($p < 0,0005$) unter denen der jüngsten Tiere. Von den kranken Tieren haben, im Gegensatz zu den gesunden, die ältesten, 7 Monate alten Tiere, die niedrigsten Phosphat-Konzentrationen im Serum. Alle Phosphat-Konzentrationen sind in Tab. 11 zusammengestellt, ihre gegenseitigen Relationen veranschaulicht Abb. 2.

In der Gruppe I befinden sich die Werte der kranken Tiere nur geringfügig unter denen der gesunden, und in der Gruppe III liegen sie in einem sehr ähnlichen Bereich. Nur die 3 Monate alten kranken Versuchstiere zeigen signifikant ($p < 0,05$) höhere Serum-Phosphat-Werte als die Kontrolltiere gleichen Alters.

Tabelle 10

Serum-Calcium-Gehalt bei Ratten verschiedenen Lebensalters
mit Adjuvantserkrankung, verglichen mit gesunden Kontrollen

<u>Mittelwerte des Calcium in mval/l</u>				
	<u>n</u>	<u>$\bar{x}$</u>	<u>s</u>	<u>p</u>
Gruppe I				
1 Monat alte Kontrolltiere	11	4,6	1,48	> 0,05
Versuchstiere	10	5,09	0,97	
Gruppe II				
3 Monate alte Kontrolltiere	11	6,14	1,49	> 0,05
Versuchstiere	11	5,88	1,02	
Gruppe III				
7 Monate alte Kontrolltiere	11	4,26	0,22	> 0,05
Versuchstiere	11	4,42	0,17	

3.3.7 Die alkalische Phosphatase

Ein paralleles Verhalten zum anorganischen Phosphat zeigt die alkalische Phosphatase (vergl. Abb. 2 und Abb. 3). Deutlich ist bei den gesunden Tieren die Abnahme der mittleren Enzymaktivität mit zunehmendem Lebensalter. Die Tiere der Gruppen II und III haben signifikant niedrigere Werte ($p < 0,0005$) als die der Gruppe I. Die ältesten, 7 Monate alten Tiere haben (nicht signifikant) niedrigere Werte als die 3 Monate alten.

Bei den 3 und 7 Monate alten, kranken Versuchstieren unterscheiden sich die mittleren Enzymaktivitäten nur unwesentlich voneinander, beide aber liegen signifikant (jeweils $p < 0,0005$) unter den Durchschnittswerten der jüngsten Tiere.

Im Vergleich der kranken mit den gesunden Tieren einer Altersgruppe fallen die signifikant höheren Werte der ältesten Versuchstiere gegenüber den gesunden Kontrolltieren auf. ($p < 0,02$), während in den beiden anderen Gruppen keine signifikanten Unterschiede bestehen. Bei den jüngsten Tieren haben die gesunden etwas höhere Werte, bei den 3 Monate alten liegen dagegen die Werte der kranken Tiere etwas höher. Die genauen Ergebnisse sind aus Tab. 12 ersichtlich.

3.3.8 Verhalten der Feuchtgewichte sowie des DNS-, RNS- und Protein-Gehaltes lymphatischer Organe

3.3.8.1 Veränderungen im Rahmen der Primärreaktion

3.3.8.1.1 Makroskopisch sichtbare Veränderungen am Injektionsort

Wenige Tage nach Injektion des Freundschens Adjuvans in die Schwanzbasis ließ sich eine Verdickung und Rötung in der Umgebung der Injektionsstelle nachweisen. Bei einem der 7 Monate alten Tiere zeigte sich eine umschriebene, etwa pfenniggroße Nekrose mit Ulzerationen am Injektionsort.

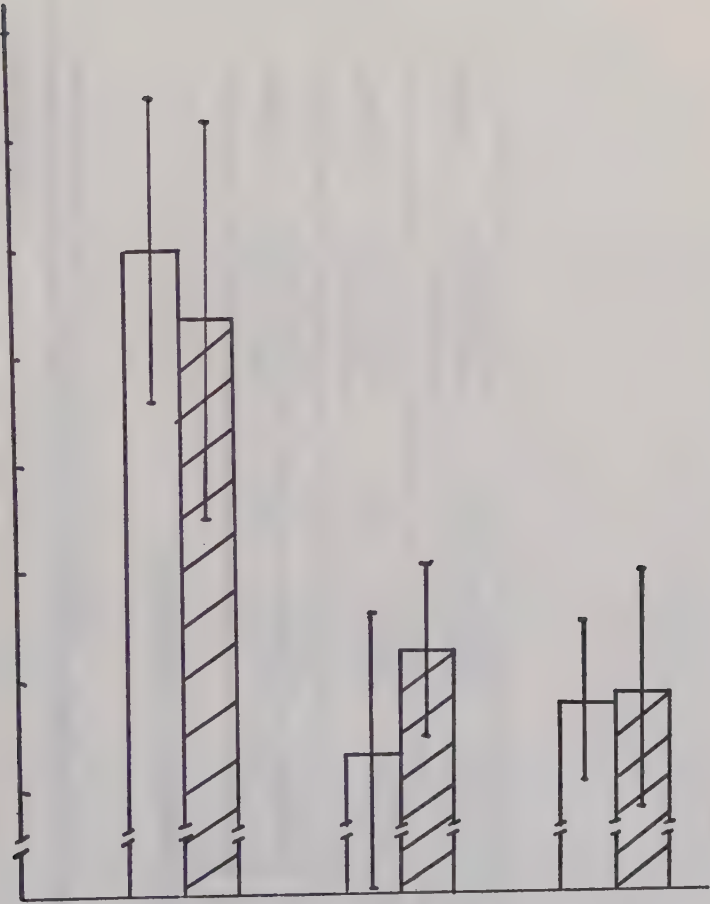
Tabelle 11

Anorganisches Phosphat im Serum von Ratten verschiedenen Lebensalters mit Adjuvantserkrankung, verglichen mit gesunden Kontrollen

<u>Anorganisches Phosphat in mg/100ml</u>				
	n	$\bar{x}$	s	p
Gruppe I				
1 Monat alte Kontrolltiere	11	10,95	1,38	> 0,05
Versuchstiere	11	10,33	1,87	
Gruppe II				
3 Monate alte Kontrolltiere	11	6,28	1,30	< 0,05
Versuchstiere	11	7,25	0,79	
Gruppe III				
7 Monate alte Kontrolltiere	11	6,74	0,75	> 0,05
Versuchstiere	11	6,86	1,13	

Anorg.
Phosphat
in
mg/100ml
12

11
10
9
8
7
6



1 Monat 3 Monate 7 Monate
alte Tiere

Abbildung 2

Anorganisches Phosphat im Serum von Ratten mit
Adjuvanskrankheit und von Kontrolltieren in
3 Altersgruppen.



=Kontrolltiere



=Versuchstiere

Tabelle 12

Serum-Aktivität der alkalischen Phosphatase bei Ratten verschiedenen Lebensalters ohne und mit Adjuvanerkrankung

	n	Alkalische Phosphatase in mU/ml			p
		$\bar{x}$	s		
Gruppe I					
1 Monat alte Kontrolltiere	10	384,93	83,14		
Versuchstiere	11	332,07	77,82		> 0,05
Gruppe II					
3 Monate alte Kontrolltiere	11	220,39	84,72		
Versuchstiere	11	245,70	53,39		> 0,05
Gruppe III					
7 Monate alte Kontrolltiere	11	183,65	43,74		
Versuchstiere	11	237,26	47,36		< 0,02

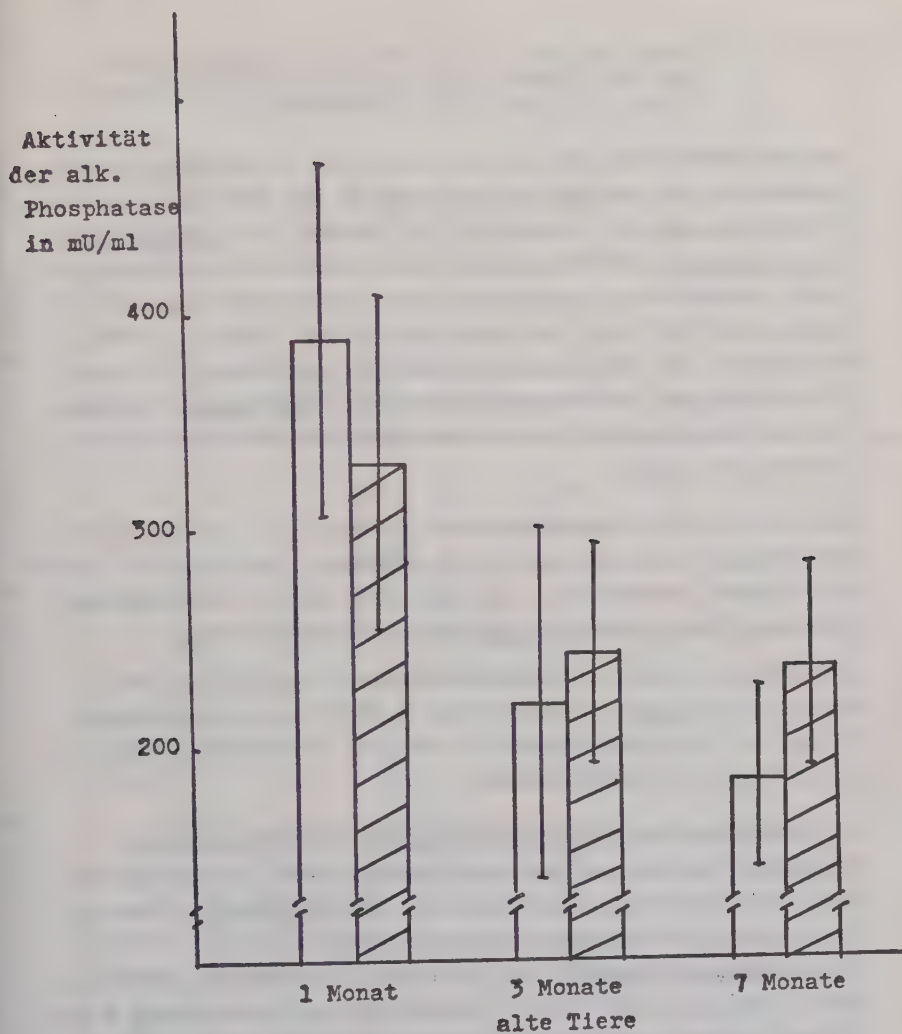


Abbildung 3

Serum-Aktivität der alkalischen Phosphatase bei Ratten verschiedenen Lebensalters ohne und mit Adjuvanerkrankung.



=Kontrolltiere



=Versuchstiere

3.3.8.1.2 Feuchtgewichte, DNS-, RNS- und Protein-Gehalt der die Injektionsstelle primär drainierenden inguinalen Lymphknoten

Die Primärreaktion spielt sich vor allem in den inguinalen Lymphknoten als erster Drainagestation ab. Sie war in allen 3 Altersgruppen zu beobachten. So stiegen die Lymphknoten-feuchtgewichte nach Injektionen des Freundschens Adjuvans in allen Altersstufen statistisch hochsignifikant auf durchschnittlich 300 % an, am stärksten in der Gruppe II (Tab. 13 und Abb. 4). In gleicher Weise war, ebenfalls in allen 3 Altersgruppen, der chemisch bestimmte DNS-Gehalt (bezogen auf das Feuchtgewicht des ganzen Lymphknotens) statistisch signifikant erhöht.

Geht man von der vereinfachenden Annahme aus, daß alle Zellen diploid sind und jede einen DNS-Gehalt von 6×10^{-12} besitzt (NOHL, BENEKE (3)), so läßt sich aus der ermittelten DNS-Menge leicht die Zellzahl des Organes errechnen.

Im einzelnen stieg der durchschnittliche DNS-Gehalt und damit die Zellzahl in der Gruppe I um 62 %, in der Gruppe II um 218 %, in der Gruppe III um 91 % im Vergleich mit den gesunden Kontrolltieren.

Die Messungen des Gesamt-Proteins und des RNS-Gehaltes (wiederum bezogen auf das Feuchtgewicht des gesamten Lymphknotens) ergeben das gleiche Bild. Der RNS-Gehalt stieg in allen drei Altersgruppen hochsignifikant auf 250 - 300 %. Der Gesamtproteingehalt in inguinalen Lymphknoten erhöhte sich sogar auf 200 - 400 %, jedoch nur bei den Gruppen I und II statistisch signifikant. Deutlich ist zu erkennen, daß wiederum die Gruppe II die größten "Zuwachsraten" aufweist.

Die Berechnung des RNS-Gehaltes pro Zelle ergab in der Gruppe I und II eine statistisch signifikante Erhöhung, der Protein-Gehalt pro Zelle ergab keine signifikante Veränderungen.

Tabelle 13
Feuchtgewichte sowie chemische Bestimmung des DNS-, RNS- und Gesamtproteingehaltes von beiden inguinalen (drainierenden)
Lymphknoten bei Adjuvans-Arthritis in Abhängigkeit vom Lebensalter (3 Altersgruppen von Ratten)

Bestimmung	Lebensalter					
	1 Monat		3 Monate		7 Monate	
	Kontrolltiere	Versuchtiere p	Kontrolltiere	Versuchtiere p	Kontrolltiere	Versuchtiere p
Lymphknoten- feuchtgewicht (in 10^{-3} g)	40,5 $\pm$ 9,2 (n = 11)	117,7 $\pm$ 64,3 (n = 12) ◀ 0,001	48,5 $\pm$ 9,2 (n = 10)	170,4 $\pm$ 136 (n = 13) ◀ 0,001	56,7 $\pm$ 32,7 (n = 9)	168 $\pm$ 168 (n = 14) ◀ 0,001
DNS-Gehalt (in 10^{-6} g)	172 $\pm$ 77 (n = 11)	278,3 $\pm$ 197 (n = 11) ◀ 0,001	232,9 $\pm$ 118 (n = 10)	741,6 $\pm$ 704 (n = 13) ◀ 0,001	398 $\pm$ 236 (n = 10)	760 $\pm$ 659 (n = 12) ◀ 0,001
RNS-Gehalt (in 10^{-6} g)	379 $\pm$ 127 (n = 10)	1031 $\pm$ 615 (n = 12) ◀ 0,001	376,3 $\pm$ 106 (n = 10)	1181,7 $\pm$ 884 (n = 12) ◀ 0,01	716 $\pm$ 219 (n = 11)	1786 $\pm$ 1327 (n = 12) ◀ 0,001
Gesamt-Protein Gehalt ³ (in 10^{-3} g)	3,21 $\pm$ 0,6 (n = 11)	9,65 $\pm$ 6,7 (n = 12) ◀ 0,001	4,1 $\pm$ 1,2 (n = 10)	16 $\pm$ 13 (n = 13) ◀ 0,01	8,5 $\pm$ 7,97 (n = 11)	17 $\pm$ 13,7 (n = 12) ◀ 0,05
Zellzahl ($\times 10^6$)	28 $\pm$ 13	45 $\pm$ 34 ◀ 0,05	39 $\pm$ 20	116 $\pm$ 116 ◀ 0,025	66 $\pm$ 40	127 $\pm$ 110 ◀ 0,05
RNS/Zelle (in 10^{-12} g)	13,6 $\pm$ 4,4	28,6 $\pm$ 20 ◀ 0,001	10,8 $\pm$ 4	13,25 $\pm$ 5 ◀ 0,02	12,9 $\pm$ 5,55	15,1 $\pm$ 5,04 ◀ 0,05
Protein/Zelle (in 10^{-12} g)	135 $\pm$ 86	258 $\pm$ 216 ◀ 0,05	114 $\pm$ 33	168 $\pm$ 80 ◀ 0,05	124,5 $\pm$ 40	174 $\pm$ 86 ◀ 0,05

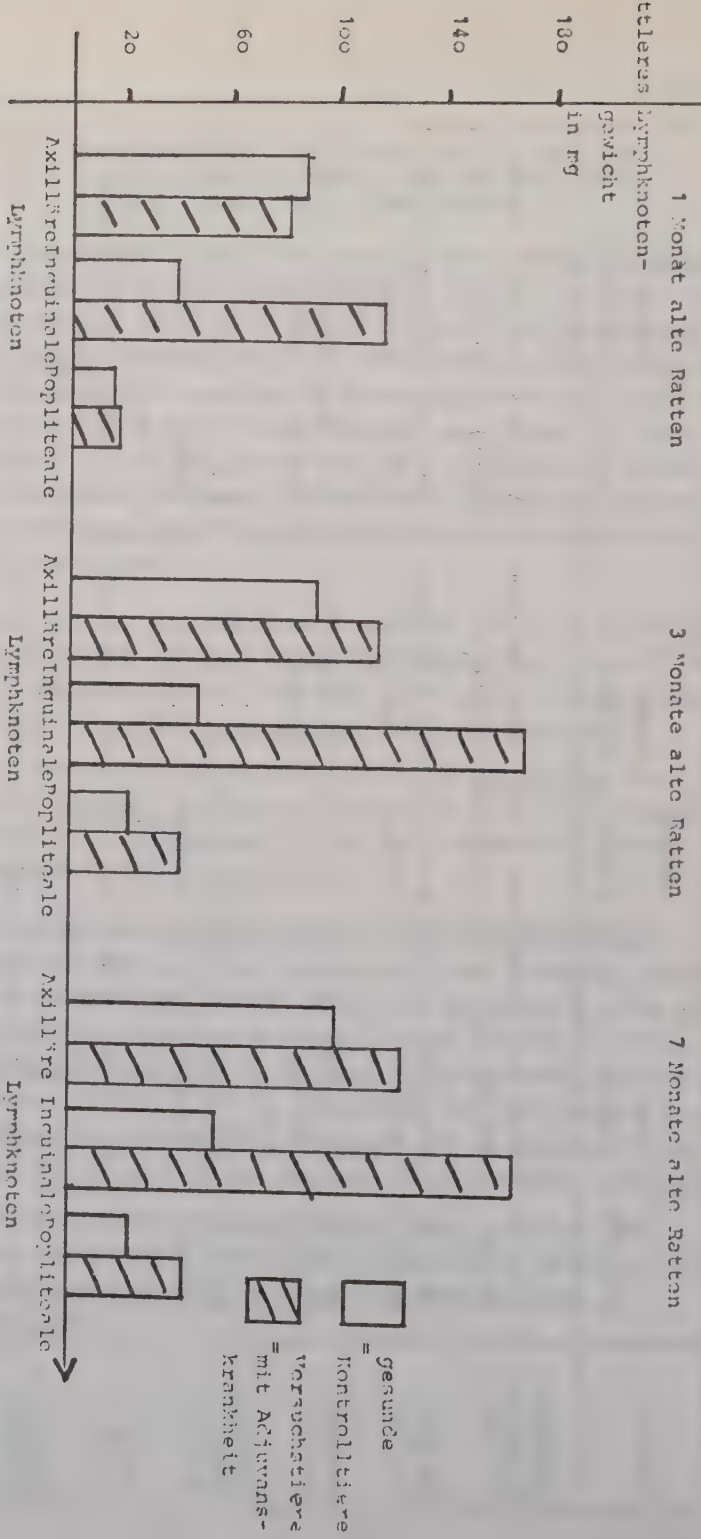


Abb. 4 Mittlere Feuchtgewichte der die Injektionsstelle drainierenden (inguinalen und axillären) und nicht drainierenden (poplitealen) Lymphknoten (3 Altersgruppen)

3.3.8.1.3 Feuchtgewichte, DNS-, RNS- und Protein-Gehalt der die Injektionsstelle drainierenden axillären Lymphknoten

In dem von uns verwendeten Arthritismodell gehören auch die axillären Lymphknoten zu den die Injektionsstelle drainierenden Lymphknoten. Sie stellen gegenüber den primär drainierenden inguinalen eine entferntere Station dar. Die Feuchtgewichte der axillären Lymphknoten stiegen in den Gruppen II und III deutlich und statistisch signifikant an. Die Gewichtszunahme ist jedoch wesentlich geringer ausgeprägt als bei den primär drainierenden Inguinal-Knoten. Sie beträgt bei beiden Gruppen ca. 25 % (Tab. 14 und Abb. 4).

Der DNS-Gehalt und die Zellzahl dieser Lymphknoten steigen in den Gruppen II und III ebenfalls an, signifikant sind jedoch nur die DNS-Zunahme in Gruppe II und die Zellzahlerhöhung in Gruppe III. Dagegen findet sich in der Gruppe I jeweils ein signifikanter Abfall der DNS-Menge und der Zellzahl. Ein ähnliches Verhalten zeigt der RNS-Gehalt in dieser Altersgruppe.

Das Gesamt-Protein der axillären Lymphknoten steigt bei den 3 Monate alten Tieren um ca. 60 % an (Tab. 14).

3.3.8.2. Veränderungen im Rahmen der Sekundärreaktion

3.3.8.2.1 Makroskopisch sichtbare Pfotenveränderungen (s. auch Kapitel 3.1)

Drei Wochen nach Injektion des Freundschens Adjuvans war es bei den Tieren je nach Alter ganz verschieden oft zu einer sichtbaren Rötung und Schwellung an den unteren Sprunggelenken der Hinterpfoten gekommen (siehe Tab. 15).

Tabelle 14

Feuchtgewichte sowie chemische Bestimmung des DNS-, RNS- und Gesamtproteingehaltes von beiden axillären (drahierenden) Lymphknoten bei Adjuvans-Arthritis in Abhängigkeit vom Lebensalter (3 Altersgruppen von Ratten)

Bestimmung	Lebensalter			
	Kontrolltiere	1 Monat Versuchstiere	p	
Lymphknoten- feuchtgewicht (in 10^{-3} g)	88 $\pm$ 12 (n=10)	82 $\pm$ 28 (n=12)	> 0,05	
DNS-Gehalt (in 10^{-6} g)	425 $\pm$ 148 (n=11)	249 $\pm$ 101 (n=7)	< 0,05	
RNS-Gehalt (in 10^{-6} g)	1264 $\pm$ 419 (n=10)	753 $\pm$ 325 (n=12)	< 0,001	
Gesamt-Protein- Gehalt (in 10^{-3} g)	8,2 $\pm$ 2,5 (n=10)	7,05 $\pm$ 2,8 (n=12)	> 0,05	
Zellzahl ($\times 10^5$)	70 $\pm$ 25	41 $\pm$ 17	< 0,005	
RNS/Zelle (in 10^{-12} g)	20,3 $\pm$ 8,6	19,6 $\pm$ 3,6	> 0,05	
Protein/Zelle (in 10^{-12} g)	127 $\pm$ 44	182 $\pm$ 53	> 0,02	
	Lebensalter			
	Kontrolltiere	3 Monate Versuchstiere	p	
	93 $\pm$ 13 (n=9)	116,2 $\pm$ 39 (n=12)	< 0,001	
	489 $\pm$ 130 (n=10)	591,5 $\pm$ 329 (n=13)	> 0,05	
	701 $\pm$ 214 (n=10)	987,3 $\pm$ 508 (n=12)	> 0,05	
	1379 $\pm$ 653 (n=11)	1267 $\pm$ 752 (n=12)	> 0,05	
	14,11 $\pm$ 3,57 (n=11)	11,1 $\pm$ 9,5 (n=14)	> 0,05	
	108 $\pm$ 66	127 $\pm$ 76	> 0,25	
	13,3 $\pm$ 5,8	11,6 $\pm$ 3,1	> 0,05	
	158,8 $\pm$ 96,7	161 $\pm$ 58	> 0,05	

Tab. 15: Häufigkeit einer makroskopisch nachweisbaren Polyarthrititis 3 Wochen nach Injektion von Freundschem Adjuvans (3 Altersgruppen von Tieren)

	Arthritishäufigkeit
1 Monat alte Tiere (Gruppe I) n=16	0 % (keine Arthritis)
3 Monate alte Tiere (Gruppe II) n=13	23 %
7 Monate alte Tiere (Gruppe III) n=13	8 %

Das Auftreten einer echten Polyarthrititis scheint eine besonders starke Ausprägung der Adjuvans-Krankheit anzuzeigen. Die Hinterpfoten sind dabei geschwollen, ihre Haut bläulich-rot. Die Beweglichkeit im Sprunggelenk ist vermindert oder aufgehoben. Bei einem der polyarthritischen Tiere fanden wir gleichzeitig eine Nekrose an der Injektionsstelle. Die Verlangsamung der zu erwartenden physiologischen Gewichtszunahme im Versuchszeitraum ist bei diesen Tieren besonders ausgeprägt. Außerdem zeigen die stark vergrößerte Milz und die Lymphknoten zum Teil schwere Verwachsungen mit der Umgebung, so daß sie nur scharf herauszulösen waren.

3.3.8.2.2 Feuchtgewicht, DNS-, RNS- und Protein-Gehalt der die Injektionsstelle nicht drainierenden poplitealen Lymphknoten

Da die Injektionsstelle die Schwanzwurzel war, drainieren die beidseitigen Knielymphknoten diese Injektionsstelle nicht, im Gegensatz zur (von uns nicht verwendeten) intraplantaren Injektionstechnik.

Die Feuchtgewichte der poplitealen Lymphknoten waren bei den 4 Wochen alten Tieren (Gruppe I) nur gering (um ca. 12 %) und nicht signifikant gesteigert. Bei den 3 Monate alten Tieren (Gruppe II) und den 7 Monate alten Tieren (Gruppe III) betrug die Gewichtszunahme jeweils ca. 100 % (statistisch signifikant) (Tab. 16 und Abb. 4).

Entsprechend stiegen der DNS-Gehalt und damit die Zellzahl in der Gruppe II um ca. 60 % (statistisch nicht signifikant) und in der Gruppe III signifikant um ca. 55 % an.

In der Gruppe I dagegen verringerten sich DNS-Menge und damit Zellenzahl geringfügig (statistisch nicht signifikant).

Beim Gesamt-Protein zeigte die Gruppe II eine kräftige Erhöhung um ca. 120 %, die statistisch signifikant war. Der RNS-Gehalt nahm in den Gruppen II und III um 80 bzw. 100 % mit statistischer Signifikanz zu.

Zusammenfassend läßt sich eine starke Reaktion nur bei den 3 und 7 Monate alten Ratten (Gruppe II und III) feststellen. Bei den jüngsten, bei der Injektion 4 Wochen alten Tieren sind alle Meßgrößen kaum verändert oder sie fallen sogar ab.

3.3.8.2.3 Feuchtgewicht, DNS-, RNS- und Protein-Gehalt der M i l z

Das Feuchtgewicht der Milz nimmt bei den 4 Wochen alten Tieren (Gruppe I) leicht ab, bei den 3 Monate alten Tieren (Gruppe II) um ca. 55 % und bei den 7 Monate alten Tieren (Gruppe III) um ca. 70 % statistisch signifikant zu.

Der DNS-Gehalt der Milz und dementsprechend die Zellzahl zeigen ein ganz ähnliches Verhalten (Abnahme um 23 % in Gruppe I, Zunahme um 61 % bei Gruppe II und um 95 % in Gruppe III, Tab. 17).

Feuchtgewichte sowie chemische Bestimmung des DNS-, RNS- und Gesamteiweißgehaltes von beiden poplitealen Lymphknoten bei Adjuvantarthritis in Abhängigkeit vom Lebensalter (3 Altersgruppen von Ratten)

43

Dies gilt auch für den RNS-Gehalt der Milz (statistisch signifikanter Abfall um 8 % in Gruppe I, signifikanter Anstieg um 70 % in Gruppe II und um 80 % in Gruppe III).

Schließlich äußerte sich die gleiche Tendenz im Verhalten des Gesamt-Proteins (bei Gruppe I geringfügiger Abfall von ca. 5 %, bei Gruppe II Vermehrung des Gesamtproteingehaltes der Milz um ca. 40 % und bei Gruppe III um 45 %, beide Steigerungen sind statistisch signifikant).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Milz als wichtiger Ort der Sekundärreaktion der Adjuvans-Erkrankung bei den etwas älteren Tieren besonders deutliche Veränderungen erkennen läßt. Während alle erwähnten Parameter in der Gruppe I zum Teil signifikant abfallen, steigen die analogen Meßwerte in den Gruppen II und III ohne Ausnahme statistisch signifikant an. Die Werte für RNS- und Protein-Gehalt pro Einzelzelle sind andererseits nur bei den jüngsten, 4 Wochen alten Tieren erhöht.

3.3.8.2.4 Feuchtgewicht, DNS-, RNS- und Protein-Gehalt des Thymus

Das Thymusfeuchtgewicht nahm nur bei den jüngsten, 4 Wochen alten Tieren um 16 % ab. Gruppe II und III wiesen nur unbedeutende Veränderungen auf (Tab. 18). Hingegen hat sich der DNS-Gehalt des Thymus und entsprechend die Zellzahl sowohl in der Gruppe II signifikant um 37 % bzw. 27 % vermindert. Der Gesamtproteingehalt des Thymus ließ keine eindeutigen Veränderungen erkennen. Die RNS-Menge des Thymus war bei den 4 Wochen alten Tieren gegenüber den gesunden Kontrolltieren vermindert.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Thymus im Sinne einer Involution nur bei den 4 Wochen alten Tieren einen Rückgang des Gewichtes und des DNS-Gehaltes zeigt. Bei den 3 Monate alten Tieren ist dieses Verhalten noch deutlich,

Feuchtgewichte sowie chemische Bestimmung des DNS-, RNS- und Gesamtproteingehaltes der Milz bei Adjuvantarthritis in Abhängigkeit vom Lebensalter (3 Altersgruppen von Ratten)

Bestimmung	Lebensalter				p
	1 Monat Versuchstiere	Kontrolltiere	3 Monate Versuchstiere	7 Monate Versuchstiere	
Feuchtgewicht (in 10 ⁻³ g)	582 ± 59 (n = 12)	595,5 ± 33,4 (n = 11)	864,8 ± 370 (n = 12)	905,1 ± 239 (n = 14)	< 0,001
DNS/Gesamtorgan (in 10 ⁻⁶ g)	2864 ± 692 (n = 12)	3724 ± 567 (n = 11)	4870 ± 2653 (n = 13)	6197 ± 812 (n = 14)	< 0,001
RNS/Gesamtorgan (in 10 ⁻⁶ g)	4251 ± 639 (n = 11)	4674 ± 336 (n = 10)	4327 ± 2408 (n = 13)	6619 ± 1742 (n = 14)	< 0,001
Protein/ Gesamtorgan (in 10 ⁻³ g)	74 ± 8,6 (n = 11)	71 ± 5,7 (n = 11)	99,5 ± 50 (n = 12)	131 ± 34,5 (n = 14)	< 0,001
Zellzahl (× 10 ⁶)	506 ± 58	621 ± 96	804 ± 447	1033 ± 136	< 0,0005
RNS/Zelle (in 10 ⁻¹² g)	8,4 ± 0,9	7,6 ± 0,8	5,6 ± 2,1	6,3 ± 0,97	> 0,05
Protein/Zelle (in 10 ⁻¹² g)	150 ± 12,5	117,3 ± 21	122 ± 30	125 ± 25,7	< 0,001

aber geringer ausgeprägt, während bei den 7 Monate alten Ratten der Thymus offensichtlich nicht mitreagiert hat.

3.3.9 Papierelektrophorese der Blutseren

Die Seren sämtlicher Versuchs- und Kontrolltiere wurden mit der Papierelektrophorese nach GRASSMANN und HANNIG (21) aufgetrennt. Unsere Werte stellten wir den Normalwerten gegenüber, die SPLINTER und HOFFMANN (46) an männlichen Ratten im Alter von 30, 105 und 260 Tagen gefunden haben. Dabei zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Werten unserer Kontrolltiere und den Werten dieser Autoren (z.B. im altersabhängigen Abfall der Albumine und im Anstieg der β -Globuline). Da sich aber die α_1 - und α_2 -Globulin-Fraktionen mit der von uns verwendeten Papierelektrophorese - im Gegensatz zu den üblichen Befunden am menschlichen Serum - nur unvollständig trennen ließen, faßten wir die α_1 - und α_2 -Globulin-Fraktionen zu einem Wert zusammen. Ebenso verfahren wir mit den β - und γ -Globulin-Fraktionen. Schließlich errechneten wir noch den Albumin/Globulin-Quotienten als Ausdruck des Verhältnisses zwischen den grob- und fein-dispersen Eiweißanteilen.

Im einzelnen fanden wir beim Vergleich zwischen kranken Tieren und Kontrolltieren einen statistisch signifikanten Abfall der Albumine in allen Altersgruppen, und zwar

- in der Gruppe I um etwa 10 %,
- in der Gruppe II um etwa 20 %,
- in der Gruppe III um etwa 18 %.

Die α -Globuline zeigten keine nennenswerten Veränderungen. Die addierten β - und γ -Globuline jedoch zeigten in der Gruppe I (4 Wochen alte Tiere) eine signifikante Zunahme um ca. 25 %, in der Gruppe II (3 Monate alte Tiere) eine signifikante Zunahme um ca. 40 % und in der Gruppe III (7 Monate alte Tiere) eine signifikante Zunahme um ca. 25 %.

Bestimmung	Lebensalter				7 Monate			
	Kontrolliere	1 Monat Versuchstiere	p	Kontrolliere	3 Monate Versuchstiere	p	Kontrolliere	Versuchstiere p
Feuchtwicht (in 10^{-3} g)	647 $\pm$ 131 (n=11)	550 $\pm$ 102 (n=12)	< 0,02	278 $\pm$ 96,4 (n=10)	281 $\pm$ 85,3 (n=13)	> 0,05	229 $\pm$ 85 (n=11)	211 $\pm$ 80,1 (n=14) > 0,05
DNS/Gesamt- organ (in 10^{-6} g)	5956 $\pm$ 1768 (n=10)	3848 $\pm$ 1150 (n=11)	< 0,001	3083 $\pm$ 1028 (n=9)	2240 $\pm$ 858 (n=13)	< 0,01	2842 $\pm$ 1015 (n=11)	2981 $\pm$ 2102 (n=14) > 0,05
RNS/Gesamt- organ (in 10^{-6} g)	7099 $\pm$ 1568 (n=11)	5746 $\pm$ 1375 (n=11)	< 0,01	2209 $\pm$ 889 (n=10)	2040 $\pm$ 659 (n=13)	> 0,05	2698 $\pm$ 1130 (n=10)	2363 $\pm$ 1270 (n=14) > 0,05
Protein/ Gesamtorgan (in 10^{-3} g)	58,4 $\pm$ 12 (n=11)	53 $\pm$ 9,4 (n=11)	> 0,05	27 $\pm$ 9,3 (n=10)	29,6 $\pm$ 10 (n=13)	> 0,05	32,1 $\pm$ 13,9 (n=11)	27,7 $\pm$ 10,3 (n=13) > 0,05
Zellzahl ($\times 10^6$)	999 $\pm$ 287	637 $\pm$ 196	< 0,002	502 $\pm$ 181	373 $\pm$ 143	> 0,05	473 $\pm$ 169	497 $\pm$ 351 > 0,4
RNS/Zelle (in 10^{-12} g)	7,8 $\pm$ 1,2	9,1 $\pm$ 1,06	< 0,001	4,5 $\pm$ 1,2	5,7 $\pm$ 1,2	< 0,001	5,6 $\pm$ 1,3	5,2 $\pm$ 1,1 > 0,05
Protein/Zelle (in 10^{-12} g)	61,6 $\pm$ 16	84,7 $\pm$ 15,7	> 0,001	52,8 $\pm$ 14,4	86,1 $\pm$ 35	< 0,02	66,2 $\pm$ 23,5	63,1 $\pm$ 26 > 0,05

Tabelle 19
 Serumweißfraktionen in Relativ-% und Albumin/Globulin-Quotient bei Adjuvans-Arthritis in Abhängigkeit vom Alter
 (3 Altersgruppen)

	Kontrolltiere	Lebensalter				Kontrolltiere	7 Monate	
		1 Monat Versuchstiere	p	3 Monate Versuchstiere	p		Versuchstiere	p
Albumin (Relativ-%) Normalwerte	53,0 $\pm$ 6,9 54,1 $\pm$ 1,3	48,2 $\pm$ 3,9	$\leq$ 0,025	46,5 $\pm$ 4,0 41,5 $\pm$ 0,9	37,0 $\pm$ 7,5	$\leq$ 0,0005	47,1 $\pm$ 4,8 35,8 $\pm$ 1,4	40,3 $\pm$ 7,3 $\leq$ 0,01
α_1 Globuline (Relativ-%) Normalwerte: $\bar{x}$	24,9 $\pm$ 3,6 25,0	24,5 $\pm$ 2,9	$\geq$ 0,35	27,0 $\pm$ 6,1 28,2	27,3 $\pm$ 6,4	$\geq$ 0,45	26,2 $\pm$ 3,6 28,7	25,9 $\pm$ 4,6 $\geq$ 0,40
β_2 -Globu- line (Relativ-%) Normalwerte: $\bar{x}$	22,1 $\pm$ 3,5 20,6	27,3 $\pm$ 3,0	$\leq$ 0,0005	25,3 $\pm$ 5,1 30,6	35,8 $\pm$ 5,1	$\leq$ 0,0005	26,7 $\pm$ 4,2 35,6	32,8 $\pm$ 6,1 $\leq$ 0,01
Albumin/Globu- lin-Quotient	1,17 $\pm$ 0,35	0,94 $\pm$ 0,14	$\leq$ 0,025	0,88 $\pm$ 0,14	0,61 $\pm$ 0,17	$\leq$ 0,0005	0,90 $\pm$ 0,18	0,69 $\pm$ 0,2 $\leq$ 0,0125

x errechnet nach den von SPLINTER und HOFFMANN (1967) für männliche Wistaratten (Jena) im Alter von 30, 105 und 280 Tagen angegebenen Werten

Der Albumin/Globulin-Quotient verringerte sich in allen 3 Altersgruppen jeweils statistisch signifikant um 15 - 25 % (Tab. 19).

3.4 Untersuchung auf Rheumatoidfaktoren

Die Seren aller Versuchs- und Kontrolltiere wurden auf die bei menschlicher rheumatoider Arthritis auftretenden Rheumatoidfaktoren untersucht. Wir benutzten dazu den Latex-RF-Tropfentest der Behringwerke Marburg. Wir erhielten ohne Ausnahme negative Ergebnisse. Bei keinem Versuchs- oder Kontrolltier ließen sich somit Antikörper gegen an Latexpartikel gebundenes Human- γ -Globulin im Rattenserum finden.

4.0 Diskussion

Bei unseren Versuchstieren kam es nach der Injektion des Freundschens Adjuvans regelmäßig innerhalb von Stunden zu einer starken Schwellung und Rötung, in einzelnen Fällen auch zu einer sekundär-infizierten Ulzeration an der Schwanzwurzel. Nach durchschnittlich 2 Wochen konnten wir dann an den Sprunggelenken Rötung, Schwellung und Bewegungsbehinderung beobachten, also eine Polyarthrititis. Diese Polyarthrititis trat jedoch bei den 3 verwendeten Altersgruppen mit ganz unterschiedlicher Häufigkeit auf. Bei den jüngsten, 4 Wochen alten Tieren konnten wir in keinem einzigen Fall eine Arthritis an irgendeinem Gelenk sehen. Die Beobachtungen von PEARSON und WOOD (37) werden dadurch bestätigt. Hingegen zeigten sich bei der Gruppe II am häufigsten manifeste Erscheinungen: 23 % der Tiere erkrankten an Arthritis. Die 3 Monate alten Tiere sind also zur Auslösung der sekundären Arthritis in unserer Versuchsanordnung am besten geeignet. In der Gruppe III (7 Monate alte Tiere) zeigten nur 8 % der Tiere Gelenkveränderungen. Zusammengefaßt sinkt also die Häufigkeit einer durch Freundschens Adjuvans induzierten Arthritis bei dem von uns verwendeten Modell altersabhängig in der Reihenfolge: 3 Monate alte Tiere - 7 Monate alte Tiere - 4 Wochen alte Tiere.

Bei der Betrachtung unserer Ergebnisse fällt auf, daß die Normalwerte der Fermentaktivitäten sowie der Calcium- und Phosphorspiegel bei gesunden Ratten zum Teil ganz erheblich von denen beim Menschen differieren. Darauf wurde schon von SCHMIDT (43), HEROLD und KEMPER (22) sowie GLENN u.M. (17, 18) hingewiesen. Insbesondere liegen die Normalwerte der SGOT und SGPT bei Ratten weit über denen des Menschen. Die großen Normwertschwankungen, die man in der Literatur findet (sie bewegen sich für die SGOT zwischen 27 und 137 mU/ml und für die SGPT zwischen 7 und 35 mU/ml), sind natürlich auch

vom Alter der Tiere, von der verwendeten Bestimmungsmethode und - dies ist besonders auffallend - vom untersuchten Tierstamm bzw. der Züchtung abhängig. Hinsichtlich der Altersabhängigkeit fanden HEROLD und KEMPER (22) eine Abnahme der SGOT und einen Anstieg der SGPT mit zunehmendem Alter. Nach unseren Untersuchungen verhielt sich die SGOT ebenso wie die SGPT, d.h. beide Enzymaktivitäten zeigten bei den gesunden Tieren eine Tendenz zur Zunahme mit dem Alter.

Untersucht man nun den Einfluß der Adjuvanserkrankung auf diese beiden Fermentaktivitäten, so fällt eine deutliche und auch statistisch signifikante Erhöhung sowohl der SGOT als auch der SGPT bei den ältesten von uns verwendeten, 7 Monate alten Tieren auf. Bei den 3 Monate alten Versuchstieren waren Transaminasen-Anstiege nicht zu verzeichnen, dagegen fanden wir bei den jüngsten (4 Wochen alten) Tieren der Gruppe I einen signifikanten Anstieg der SGPT.

Unsere Befunde weichen damit etwas von den vergleichbaren von GLENN u.M. (18) ab. Die von ihnen untersuchten Upjohn-Sprague-Dawley-Ratten, die gewichtsmäßig etwa unserer Gruppe I entsprachen, reagierten nach Adjuvans-Injektionen mit einem Anstieg der LDH, der alkalischen Phosphatase, Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH) und SGOT, jedoch mit einer Herabsetzung der Enzymaktivität der SGPT. Die gleichen Autoren untersuchten auch die Exsudate von lokal induzierten D- α -Tocopherol-Granulomen; sie fanden hier ebenfalls eine starke Transaminasen-Erhöhung.

Es erhebt sich die Frage, ob diese Verschiebungen von Enzymaktivitäten spezifisch mit Läsionen bestimmter Organe, also besonders der Leber, erklärt werden können. Eingehende histologische Studien (23, 24) sprechen jedoch eher dafür, daß es sich bei den Transaminasen-Erhöhrungen um ganz unspezifische Befunde infolge einer allgemeinen entzündungsbedingten Gewebsschädigung handeln dürfte. JONES und WARD (23) heben in

der Beurteilung ihrer histologischen Ergebnisse die Intaktheit des Leberparenchyms besonders hervor. Es fanden sich nur einige zerstreute, nicht zusammenfließende Granulome, die aus wenigen Granulocyten, Riesenzellen und Fettvakuolen bestanden. Auch PEARSON und WOOD (37) sowie SILVERSTEIN und SOKOLOFF (45) sahen lediglich in 5 % der Fälle Zellgranulome in der Leber; nur KEITEL u.M. (24) sind Granulome in der Leber häufiger aufgefallen. Eine generalisierte Leberentzündung oder eine Cholestase bei Adjuvans-Arthritis wurde jedenfalls nie beobachtet. Die Herkunft der erhöhten Serumtransaminasen aus Leberzellen ist daher sehr unwahrscheinlich.

Wie die Transaminasen scheint auch die Erhöhung der alkalischen Phosphatase, die nur bei den ältesten, 7 Monate alten Tieren mit Adjuvans-Arthritis signifikant war, aus den gleichen Gründen nicht Folge einer Leberzellschädigung zu sein.

Das teilweise parallele Verhalten der alkalischen Phosphatase mit dem anorganischen Phosphat bei den kranken Tieren weist unseres Erachtens vielmehr darauf hin, daß beide biochemischen Befunde Ausdruck von Knochenumbauvorgängen sind, die alkalische Phosphatase also aus den Osteoblasten stammt. Es ist bekannt (24), daß es schon in frühen Stadien der Adjuvans-Arthritis zur Periostproliferation, Osteolyse und Knochenneubildung sowie zur Ausbildung eines Markpannus kommen kann; röntgenologisch ist eine Demineralisierung des Skeletts erkennbar. Bei schweren Verläufen wird homogener Kalk in die zerstörten Knochen und Weichteilpartien eingelagert. Da jedoch - statistisch signifikant nur bei den 3 Monate alten Ratten - die Adjuvanskrankheit offensichtlich auch einen Anstieg des anorganischen Serumphosphates induzieren kann, müßte im Zusammenhang mit den Verschiebungen

der alkalischen Phosphatase und den völlig normalen Serumcalcium-Werten bei allen 3 Altersgruppen auch an einem sekundären (renalen) Hyperparathyreoidismus gedacht werden, für den diese Konstellation ja typisch ist. Dann wären jedoch feingewebliche Veränderungen an den Nieren zu erwarten. Diese konnten jedoch in eingehenden histologischen Studien ebensowenig nachgewiesen werden wie an der Leber (23, 24, 26). Es fanden sich nur in vereinzelten Fällen Granulome, jedoch keine sichtbaren Schäden der Tubuli (24). Gegen eine Nierenfunktionsstörung sprechen auch die bei einem etwas modifizierten Arthritismodell normal gefundenen Serumharnstoff- und Kreatinin-Werte (42).

Die Normalwerte des Serumcalciums bewegen sich bei den Ratten in ähnlicher Höhe wie beim Menschen, was bereits von KERSTEN u.M. (26) und BALLOWITZ (2), mit dessen Werten unsere Befunde besonders gut übereinstimmen, beobachtet wurde. Bei den 3 Monate alten Tieren waren die Werte am höchsten und bei den 7 Monate alten am niedrigsten.

Für die Normwerte der alkalischen Phosphatase fällt eine andere Altersabhängigkeit auf; dies ist schon von KEMPER und HEROLD (22) beschrieben worden. Die jüngsten Tiere besitzen die höchsten Werte, während die Phosphatasewerte mit zunehmendem Alter abnehmen.

Ein analoges Verhalten ist vom Menschen bekannt; die höheren Aktivitäten der alkalischen Phosphatase bei jungen Säugtieren wird mit dem intensiven Wachstum der Knochen zu dieser Zeit erklärt.

Vir führten bei der Adjuvans-Krankheit die HBDH-Untersuchungen vor allem unter der Fragestellung durch, ob Änderungen ihrer Aktivitäten mit histologischen Veränderungen an Herz und Muskulatur korrelierbar sind. Wie eingehende

Untersuchungen zur Spezifität der HBDH ergaben (FORSTER und FEISSELI (14)), kann ihre Aktivität außer beim Herzinfarkt des Menschen und bei primären Myopathien auch bei Lungeninfarkt, Pankreatitis und Lebererkrankungen erhöht sein.

In 40 durchuntersuchten Ratten fanden PEARSON u.M. (36) sowie auch KEITEL u.M. (24) und JONES und WARD (23) in weiteren Untersuchungen keine signifikanten histologischen Veränderungen an Skelett- und Herzmuskulatur.

Es war in keiner Altersgruppe unter den Versuchstieren ein statistisch signifikanter Anstieg der HBDH-Aktivität zu verzeichnen, wenn auch in den Gruppen II und III die Werte der Ratten mit Adjuvanserkrankung deutlich höher lagen als bei den Kontrollen. 2 Tiere der Gruppe II, die eine deutlich sichtbare Arthritis aufwiesen, haben mit 587 bzw. 359 mU/ml gegenüber dem Gruppendurchschnitt von 263 mU/ml eindeutig erhöhte Aktivitäten, bei einem anderen schwer erkrankten Tier der Gruppe III wurde dieser Befund jedoch vermißt. Möglicherweise sind auch diese erhöhten Einzelwerte Ausdruck der besonders starken Entzündung; die LDH ist ja im Exsudat von Entzündungsherden ebenfalls erhöht (17). Leider fanden wir in der Literatur keine Hinweise auf HBDH-Werte bei Ratten. Jedoch steigen nach GLENN (17) die vielleicht vergleichbaren LDH-Werte der Ratten unter der Adjuvanserkrankung mit 350 mU/ml gegenüber 150 mU/ml der gesunden Kontrolltiere deutlich an.

Hinsichtlich der "Normalwerte" gesunder Kontrollratten erzielten wir überraschenderweise Meßwerte, die denen des Menschen sehr ähnlich sind. Mit dem Lebensalter steigen diese Normalwerte ganz markant an.

Die Werte der CPK erscheinen auf den ersten Blick, verglichen mit der oberen Normwertgrenze von 50 mU/ml beim Menschen, außerordentlich hoch. Die jungen, vier Wochen alten Ratten verfügen offenbar über 2,5fach höhere Enzymaktivitäten als

der Mensch, bei den 3 Monate alten Kontrolltieren sind die CPK-Werte schon denen des Menschen angenähert. Jedoch sind bei den gesunden und kranken Tieren einer Gruppe die Aktivitäten jeweils annähernd gleich hoch. Auch dies spricht, wie die normalen HBDH-Werte, gegen eine generalisierte Muskel-erkrankung (EVERS (10)) und deckt sich mit den erwähnten morphologischen Muskelbefunden bei der Adjuvans-Arthritis.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß bei den jüngsten Versuchstieren (Gruppe I) die Aktivität der SGPT, bei den 3 Monate alten Versuchstieren (Gruppe II) das anorganische Phosphat im Serum und bei den ältesten Versuchstieren (Gruppe III) die Aktivitäten der SGPT, der SGOT und der alkalischen Phosphatase gegenüber den Kontrolltieren signifikant angestiegen sind. Aufgrund der bekannten histologischen Beobachtungen können diese Veränderungen nicht auf spezifische Organschäden zurückgeführt werden. Sie müssen vielmehr als Ausdruck der unspezifischen Entzündung, die bei den Tieren verschiedenen Alters unterschiedlich stark ausgeprägt ist, angesehen werden. Rückschlüsse auf eine Zellspezifität der untersuchten Enzymaktivitäten sind also nicht möglich.

Bereits die eben dargelegten Ergebnisse unserer biochemischen Serum-Untersuchungen bei der Adjuvans-Arthritis haben gezeigt, wie unterschiedlich Versuchstiere verschiedenen Alters reagieren. Auch für das "Angehen" der Adjuvans-Arthritis selbst wurde schon von mehreren Autoren (3, 50, 35) über eine deutliche Altersabhängigkeit berichtet. PEARSON und Mitarbeiter (35) sowie WAKSMAN und Mitarbeiter (50) gelang es nicht, an unter 5 Wochen alten Tieren eine generalisierte Polyarthrititis zu erzeugen. BENEKE und SCHMIDT (3) zeigten jedoch unter Verwendung empfindlicherer Kriterien als es die Graduierung der Arthritis nach visuellen Gesichtspunkten ist, daß zum Zeitpunkt der Injektion 4 Wochen alte Tiere sehr wohl erkranken, auch wenn sichtbare Gelenkschwellungen an den nicht injizierten Pfoten fehlen.

Neben einer eventuellen altersabhängigen Reaktionsweise biochemischer Serumwerte galt unser Interesse einer möglichen Altersabhängigkeit des DNS-, RNS- und Proteingehaltes. Insbesondere der DNS-Gehalt gibt ja einen quantitativen Hinweis auf die Zellproliferation der Organe (3). Wie die Untersuchungen von KIENZL (27) zeigen, ist bei 4 Wochen alten gesunden Ratten physiologischerweise das lymphatische System noch nicht voll ausgereift. 12 Monate alte Tiere lassen bereits deutliche Zeichen altersbedingter Veränderungen erkennen (KIENZL (27), SCHMITT und BENEKE (41), PAULINI und Mitarbeiter (33)). Für junge (4 Wochen alte) Tiere fanden BENEKE und SCHMIDT (3) und später BENEKE, MOHR und OLISCHLÄGER (4) bei der Adjuvans-Erkrankung trotz Fehlens einer äußerlich sichtbaren Arthritis eine deutlich nachweisbare Sekundärreaktion in Form einer Gewichtszunahme nicht drainierender Lymphknoten. Generalisiert und mit einer DNS-Zunahme korreliert war diese allerdings nur bei den 3 Monate alten Tieren. Diese Befunde wollten wir mit einer modifizierten Methodik nachprüfen.

Um einen möglichen Einfluß unterschiedlicher Mengen injizierter Mycobakterien zu unterdrücken, wählten wir eine andere Zusammensetzung des Freundschens Adjuvans und verabreichten allen 3 Altersgruppen von Tieren pro kg Körpergewicht fast die gleiche Menge von Mycobakterien. Wir wählten auch einen anderen Injektionsort des Freundschens Adjuvans. Bei Injektionen in die Schwanzwurzel sind die zu erwartenden sekundären Veränderungen symmetrisch.

Die Primärreaktion der an Adjuvans-Erkrankung leidenden Tiere war in unserer Versuchsanordnung in allen 3 Altersgruppen deutlich ausgeprägt. So steigen die Feuchtgewichte der inguinalen Lymphknoten durchweg signifikant auf das Dreifache ihres Ausgangsgewichtes an. Diese Vergrößerung geht mit einer ebenfalls statistisch signifikanten Steigerung der DNS-Mengen und damit der Zellzahl einher und ist darum im wesentlichen durch eine Zellvermehrung in diesen Lymphknoten bedingt. Auch die RNS- und die Protein-Mengen zeigen dieselbe

Tendenz. Aber trotz der Beteiligung aller Altersgruppen liegen die 3 Monate alten Tiere mit ihren "Zuwachsraten" an inguinalem Lymphknotengewebe an der Spitze. Besonders eindrucksvoll ist dieser Vorsprung bei der DNS-Menge bzw. den Zellzahlen und der Protein-Menge. Die Tiere der Gruppe II scheinen sich also am intensivsten mit dem injizierten antigenen Material auseinandergesetzt zu haben.

Das Verhalten des Thymus, das als Ausdruck der Schwere der Allgemeinerkrankung und nicht der Primär- oder Sekundärreaktion zu verstehen ist, zeigt überraschenderweise, daß die jüngsten, 4 Wochen alten Tiere die schwerste Allgemeinerkrankung hatten, obwohl ihre Sekundärreaktion von allen drei Altersgruppen am schwächsten ausgeprägt war. Bei ihnen hat sich der Thymus am meisten verkleinert. Jedoch ist auch noch bei den 3 Monate alten Tieren der DNS-Gehalt des Thymus - ebenfalls als Ausdruck der "stressbedingten" Involution - signifikant reduziert. Auch diese Tiere waren also erheblich allgemein beeinträchtigt.

Ein weiteres Kriterium der Allgemeinerkrankung neben der Thymusinvolution ist die Entwicklung des Körpergewichtes im Versuchszeitraum. Es zeigte sich eine Hemmung der zu erwartenden physiologischen Gewichtszunahme vor allem bei den Gruppen I und II. Es bestätigt sich damit noch einmal, daß gerade die jungen, 4 Wochen alten Tiere, wie auch ihre Thymus-Involution zeigt, sehr empfindlich auf die Injektion des Freundschens Adjuvans reagieren, auch wenn ihre Fähigkeit, eine äußerlich sichtbare sekundäre Polyarthrititis zu entwickeln, unter allen 3 Gruppen wohl infolge der altersbedingten immunologischen Unreife (KIENZL (27)) am geringsten ist. Die Injektion des Freundschens Adjuvans mit den damit verbundenen primären Entzündungen reicht anscheinend schon aus, um das normale Wachstum nachhaltig zu hemmen.

Die Gruppe III zeigt keine Veränderungen. Diese Tiere nehmen schon normalerweise kaum noch an Gewicht zu. Zu einer stressbedingten Gewichtsabnahme ist es auch nicht gekommen.

Nach dem Verhalten des Körpergewichtes und des Thymus kann man auch die Befunde der Serum-Elektrophorese in gewissem Umfang zu den Parametern der (unspezifischen) allgemeinen Krankheitsreaktion zählen. Die Albumin-Fraktion ist in allen Altersgruppen um 10 - 20 % erniedrigt. Diese Erniedrigung ist statistisch signifikant. In den Gruppen II und III zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit zwischen dem Auftreten von Gelenksentzündungen im Rahmen der Sekundärreaktion und dem Albumin-Spiegel. Je stärker die Gelenksverdickung ist, desto niedriger ist der Albuminspiegel. Diese Beobachtung machten auch LOWE (29) und FORMANEK u.M. (12). Im übrigen fallen auch bei den gesunden Kontrolltieren mit zunehmendem Alter die Albuminwerte ab. Dies wurde auch an gesunden Ratten aus anderen Züchtungen von SPLINTER und HOFFMANN (46) beobachtet.

Die von uns addierten Werte der α_1 - und α_2 -Globuline zeigen keine nennenswerten Veränderungen. Das ist etwas überraschend. GLENN (19), WEIMER u.M. (53) und FORMANEK u.M. (12) fanden ein Ansteigen der α_1 - und α_2 -Globuline. Es kann sein, daß bei unserem Arthritismodell die akute Phase am 25. Tag schon abgeklungen ist, so daß diese Fraktion schon wieder ihren Ausgangswert erreicht hat.

Die ebenfalls addierten β - und γ -Globuline weisen in allen 3 Altersstufen einen Anstieg um 25 - 40 % auf. Den größten Anstieg zeigen die Tiere der Gruppe II mit 40 %. Es ist auffallend, daß die Tiere dieser Gruppe auch am häufigsten sekundäre Gelenksentzündungen haben. Die Albumin-Globulin-Quotienten sind als Resultat der ebenbeschriebenen Verschiebungen auch in allen 3 Altersgruppen erniedrigt, am stärksten in der Gruppe II. Im Schrifttum werden die elektrophoretischen Veränderungen heute als unspezifische Antwort auf die Entzün-

dungsvorgänge aufgefaßt, die bei der Injektion des Freund-schen Adjuvans entstehen (19).

Der von uns bei allen Kontroll- und Versuchstieren ausgeführte Latex-Rheumatoidfaktoren-Tropfentest hatte ein negatives Ergebnis. Dies kommt nicht überraschend. Zahlreiche Autoren haben vergeblich Seren von Ratten mit Adjuvans-Erkrankung auf den menschlichen Rheumatoidfaktoren analoge Antikörper untersucht. Nur PEARSON (35) und KEITEL (24) berichten über positive Ergebnisse. PEARSON fand bei einem einzigen Tier einen positiven Befund, KEITEL und Mitarbeiter erhielten in 1,3 % positive Ergebnisse. Diese Autoren fassen die von ihnen nachgewiesenen Antikörper als Analoga der menschlichen Rheumatoidfaktoren auf, da sie bei arthritischen Tieren positive Latex-Reaktionen signifikant häufiger als bei Tieren ohne eine klinisch sichtbare Arthritis fanden.

Faßt man die altersspezifische Reaktionsweise unserer 1, 3 und 7 Monate alten Ratten noch einmal zusammen, so zeigen die einzelnen Tiergruppen folgende Charakteristika:

1. Die jüngsten, 4 Wochen alten Tiere entwickeln eine starke Primärreaktion, jedoch niemals eine echte Polyarthrititis. Auch mit feineren Kriterien ist eine sichere Sekundärreaktion nicht nachweisbar. Hingegen finden wir deutliche Zeichen einer schweren Allgemeinerkrankung.
2. Die 3 Monate alten Ratten haben - bei ebenfalls ausgeprägter Primärreaktion - am häufigsten eine sichtbare Arthritis. Ihre Sekundärreaktion am lymphatischen Gewebe ist von allen drei Tiergruppen die stärkste. Die Symptome einer generalisierten Erkrankung sind relativ gering ausgeprägt.
3. Unsere ältesten, 7 Monate alten Ratten, nehmen in bezug auf Stärke der Primärreaktion, Häufigkeit der sichtbaren Polyarthrititis und Intensität der Sekundärreaktion an Lymphknoten und Milz eine Stellung zwischen den 1 und 3 Monate al-

ten Tieren ein. Hinsichtlich ihres Allgemeinbefindens erwiesen sie sich als recht stabil.

Im Vergleich mit den von der Fragestellung her ähnlichen Untersuchungen von SCHMIDT und BENEKE (40) sowie BENEKE, MOHR und OLISCHLÄGER (4) ergibt sich, daß auch nach unseren Ergebnissen übereinstimmend mit denen der erwähnten Autoren zwischen der Stärke der Primärreaktion und der Sekundärreaktion keine Korrelation besteht. Während SCHMIDT und BENEKE (40) bei den jüngsten (4 Wochen alten) Tieren die stärkste Sekundärreaktion fanden, war dies bei BENEKE, MOHR und OLISCHLÄGER (4), wie auch nach unseren Resultaten, bei den 3 Monate alten Tieren der Fall. Die 4 Wochen alten Tiere, die SCHMIDT und BENEKE verwendeten, hatten aber - bezogen auf das Körpergewicht - von allen drei Altersgruppen die größte Menge Freundsches Adjuvans bekommen und möglicherweise deshalb so stark reagiert, wenn man von der anderen Injektionstechnik und der anderen Tierzucht absieht. Um vergleichbare Aussagen zu erhalten, scheint eine Dosierung des Freundsches Adjuvans nach Körpergewicht der Versuchstiere ratsam.

Die Untersuchungen zeigen, daß Tiere unterschiedlichen Alters gegenüber der mit großer Wahrscheinlichkeit auf immunologischem Wege ausgelösten Adjuvans-Arthritis ganz unterschiedlich empfänglich sind. Die fehlende Sekundärreaktion junger Tiere könnte mit der in dieser Altersgruppe bekannten morphologischen Unreife des lymphatischen Systems erklärt werden. Warum auch die ältesten Tiere nur relativ schwach mit einer Sekundärreaktion antworten, ist schwer deutbar. Untersuchungen zum Verhalten der zellgebundenen Immunität im höheren Lebensalter sind bisher kaum angestellt worden. Das Nachlassen der Tuberkulinsensibilität beim Menschen vom 50. Lebensjahr an könnte jedoch dafür sprechen, daß bei älteren Individuen diese phylogenetisch älteste Form der Immunantwort gedämpfter abläuft. Mit einem ähnlichen Mechanismus wäre dann die mangelhafte Reagibilität alter Ratten auf injiziertes Freundsches Adjuvans erklärbar.

5.0 Zusammenfassung

=====

An 57 männlichen Albino-Ratten dreier Altersgruppen (Alter: 4 Wochen, 3 und 7 Monate) wurde durch Injektion von komplettem Freundschens Adjuvans in die Schwanzbasis eine Adjuvans-Krankheit erzeugt. 56 Tiere der gleichen Altersgruppen dienten als Kontrolltiere. Am Ende der Versuchsperiode wurden folgende Untersuchungen angestellt:

1. Gelenkmessungen,
2. Bestimmung des Körpergewichtes,
3. Bestimmung der Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (SGOT), der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (SGPT), der Creatinin-Phosphokinase (CPK), der α -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (HBDH), der alkalischen Phosphatase und des Serum-Calciums,
4. Bestimmung von Gewicht, Desoxyribonucleinsäure (DNS)-, Ribonucleinsäure (RNS)- und Gesamtproteingehalt in axillären, inguinalen und poplitealen Lymphknoten sowie Thymus und Milz,
5. papierelektrophoretische Auftrennung des Serumweißes,
6. Untersuchung des Serums auf Rheumatoidfaktoren.

Während bei den Tieren mit Adjuvans-Krankheit in der Gruppe I (Alter 4 Wochen) kein Tier eine äußerlich sichtbare Arthritis entwickelte, fand sich in der Gruppe II (Alter 3 Monate) bei 23 %, in der Gruppe III (Alter 7 Monate) bei 8 % der Tiere eine Arthritis der Pfoten.

Von den biochemischen Werten waren die SGOT, die SGPT, die alkalische Phosphatase und das anorganische Phosphat im Serum statistisch signifikant im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren erhöht. Diese Veränderungen waren bei den einzelnen Altersgruppen jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Die HBDH, das Calcium und die CPK waren nicht verändert. Unter Berücksichtigung der histologischen Befunde der

Adjuvans-Arthritis, über die im Schrifttum eingehende Studien vorliegen, ist es unwahrscheinlich, daß die Erhöhungen der Enzymaktivitäten und des anorganischen Phosphates durch bestimmte Organschäden bedingt waren. Sie waren vielmehr am ehesten Folge der ausgedehnten organunspezifischen Gewebeschädigung und der arthritsbedingten regen Knochenneubildung.

Auch für die meisten biochemischen Parameter gesunder Tiere ergaben sich deutliche Altersabhängigkeiten und zum Teil große Unterschiede zu den beim Menschen bekannten Normwerten. Es fiel vor allem auf, daß die Serum-Transaminasen mit zunehmendem Lebensalter anstiegen. Noch deutlicher waren die altersabhängigen Unterschiede der HBDH. Das anorganische Serumphosphat und die alkalische Phosphatase lagen bei den jüngsten Tieren am höchsten und fielen mit zunehmendem Alter ab. Eine entsprechende Tendenz zeigten die Serum-Albumine und damit der Albumin-Globulin-Quotient. Der Serum-Calcium-Spiegel war bei den 3 Monate alten Tieren am höchsten. Die Gruppe I wies wesentlich höhere CPK-Aktivitäten auf als die Gruppe II.

Den menschlichen Rheumatoidfaktoren analoge-Anti-Gamma-Globuline konnten bei keinem einzigen Versuchs- oder Kontrolltier nachgewiesen werden.

Am lymphatischen System wurde der Unterschied zwischen Primärreaktion und Sekundärreaktion besonders deutlich, die Primärreaktion setzte sich zusammen aus Gewebsveränderungen am Injektionsort und den Veränderungen der die Injektionsstelle drainierenden Lymphknoten. Die Sekundärreaktion umfaßte die arthritische Reaktion injektionferner Gelenke, die Reaktion der nicht die Injektionsstelle drainierenden Lymphknoten und die Veränderungen der Milz. Die Involution des Thymus sowie das Verhalten des Körpergewichtes im Versuchszeitraum waren Kriterien der unspezifischen Allgemeinerkrankung. Die Gewichtsänderungen der untersuchten Organe waren proportional den Schwankungen des DNS- und Protein-Gehaltes.

Bei getrennter Analyse der für die Adjuvans-Erkrankung charakteristischen Primärreaktion und der spezifischen Sekundärreaktion sowie der unspezifischen Allgemeinerkrankung ergab sich folgendes Bild:

1. Die jüngsten, 4 Wochen alten Tiere entwickelten eine starke Primärreaktion, jedoch niemals eine echte Polyarthrititis. Auch mit feineren Parametern war eine sichere Sekundärreaktion nicht nachweisbar. Hingegen fanden sich deutliche Zeichen einer schweren Allgemeinerkrankung.
2. Die 3 Monate alten Ratten hatten - bei ebenfalls ausgeprägter Primärreaktion - am häufigsten eine sichtbare Polyarthrititis, ihre Sekundärreaktion am lymphatischen Gewebe war von allen 3 Tiergruppen die stärkste. Die Symptome der generalisierten Erkrankung waren etwas geringer ausgeprägt.
3. Die ältesten, zum Zeitpunkt der Injektion 7 Monate alten Ratten, hatten eine mittelstarke Primär- und Sekundärreaktion, der Allgemeinzustand war wenig beeinträchtigt.

Die Untersuchungen zeigten, daß Tiere unterschiedlichen Alters gegenüber der mit großer Wahrscheinlichkeit auf immunologischen Wege ausgelösten Adjuvans-Krankheit ganz unterschiedlich empfänglich waren. Die fehlende Sekundärreaktion junger Tiere könnte mit der in dieser Altersgruppe bekannten morphologischen Unreife des lymphatischen Systems erklärt werden.

- 1 AKAMATSU, Y., NISHIZAWA, H., WATANABE, S. u. KUMAGAI, A.:
Adjuvant-induced Polyarthritits in Rats - its Histogenesis; Acta Path. Jap. 16, (2), 131 - 140 (1966)
- 2 BALLOWITZ, L.:
Serumelektrolyte, Serumeiweiß und Harnstoff im Blut verschieden alter Gunn- und Wistarratten. Zeitschr. Versuchstierkunde Bd. 13, 249 - 256 (1971)
- 3 BENEKE, G., NOHL, M. u. SCHMIDT, K.:
Bedeutung des lymphatischen Systems in der Pathogenese der Adjuvans-Arthritis der Ratte; Zeitschr. f. Rheumaforschung 29, 321 - 334 (1970)
- 4 BENEKE, G., MOHR, W. u. OLISCHLÄGER, K.:
Die Adjuvans-Krankheit der Ratte in Abhängigkeit vom Lebensalter; Aktuelle Gerontologie 1, 641 - 648 (1971)
- 5 BOSMANSKÝ, K. u. SCHMIDT, K.:
Bratislav lek. (im Druck)
- 6 BURSTEIN, N.A. u. WAKSMAN, B.H.:
The Pathogenesis of Adjuvant disease in the Rat; Yale J. Biol. Med. 37, 177 (1964)
- 7 BURTON, K.:
A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of nucleic acids in animal tissues; J. Biol. Chem. 214, 59 - 70 (1955)
- 8 CERIOTTI, G.:
Determination of Nucleic Acids in animal Tissues; Journal biol. Chem. 214, 59 - 70 (1955)
- 9 DOCUMENTA GEIGY:
Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage (1960)
- 10 EVERS, C.:
Die Bedeutung der Kreatinphosphokinase (CPK) für die Diagnostik des Herzinfarkts und der Myokarditis. Med. Klinik 31, 1260 - 1265 (1963)

- 11 FLAX, M.H. u. WAKSMAN, B.H.:
Further immunologic Studies of
Adjuvant Disease in the Rat; Int.
Arch. Allergy 23, 331 - 347 (1963)
- 12 FORMANEK, K., ROSAK, M. u. STEFFEN, C.:
Weitere Untersuchungen über die
experimentelle Adjuvans-Arthritis
der Ratte; Int. Arch. Allergy 24,
1 (1964)
- 13 FORSTER, G.:
Die diagnostische Bedeutung der
Serum-Kreatinkinase. Praxis.
Schweizer Rundschau für Medizin 52,
1177 - 1183 (1963)
- 14 FORSTER, G. u. FEISLI, S.:
Zur diagnostischen Bedeutung der
-Hydroxybuttersäure-Dehydro-
genase-Aktivität des Serums.
Helvetica Medica Acta 31, 389 - 399
(1964)
- 15 FREUND, J.:
The effect of paraffin oil and
myco-bacteria on Antibody-Formation
and Sensitisation; Amer. J. Clin.
Pathol. 21, 645 - 656 (1951)
- 16 FREUND, J. u. BONANTO, M.V.:
The effect of paraffin oil, lanolin
like substance and killed tubercle
bacilli on immunisation with
diphtheria toxoid and Bact. ty-
phosum J. Immunol. 48, 325 (1944)
- 17 GLENN, E.M., GRAY, J. u. KOOYERS, W.:
Chemical Changes in Adjuvant-
Induced Polyarthritis in Rats.
Amer. J. Vet. Res. 26, 1165 (1965)
- 18 GLENN, E.M.: u. GRAY, J.:
Chemical Changes in Adj.-Induced,
Polyarthritis of Rats; J. Vet.
Res. 26, 1180 (1965)
- 19 GLENN, E.M.:
Adjuvant-Induced Arthritis: Effects
of Certain Drugs on Incidence,
Clinical Severity and biochemical
Changes; Amer. J. Vet. Res. 27,
339 (1966)
- 20 GOULLET, P.H.:
Etude électrophoretique des glyco-
proteins sériques du rat au cours
de la polyarthrite expérimentale
déterminée par l'adjuvant de Freund;
C. R. Soc. Biol. (Paris) 159, 816
(1955)

- 21 GRASSMANN, W. u. HANNIG, K.:

Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 128,
493 (1968)

- 22 HEROLD, E. u. KEMPER, F.:

Enzymatische "Leberfunktionsproben"
bei Ratten; Zeitschr. Versuchstier-
kunde 10, 285 - 291 (1968)

- 23 JONES, R.S. u. WARD, J.R.:

Studies on Adjuvant-induced Poly-
arthritis in Rats II. Histogenesis
of Joint and Visceral lesions;
Arthritis and Rheumatism 6, 23
(1963)

- 24 KEITEL, W., LOPATJONOK, A.A., PAMBOR, R., ZIEGLER, J.,
SCHUMANN, E. u. WILLMANN, K.:

Untersuchungen zur Adjuvans-
Arthritis der Ratte. II. Klinik
Serologie und Histologie; Zeitschr.
f. Rheumaforsch. 28, 351 (1969)

- 25 KEITEL, W.:

Untersuchungen zur Adjuvans-
Arthritis der Ratte. III. Unter-
suchungen zur Pathogenese. Zeitschr.
f. Rheumaforsch. 28, 434 - 441
(1969)

- 26 KERSTEN, L., HOFFMANN, H. u. ANKERMANN, H.:

Biologische Normalwerte bei
Wistar-Ratten (Jena) verschiedenen
Alters. III. Zeitschr. Versuchs-
tierkunde 9, 9 - 17 (1967)

- 27 KIENZL, H.:

Untersuchungen altersabhängiger
Veränderungen des lymphatischen
Systems d. Ratte. Inaug. Diss.
Ulm 1970

- 28 KLINGE, R. u. FRICKE, G.:

Experimentelle Untersuchungen über
anaphylaktische Entzündungen der
Gelenke. Krankheitsforschung 9,
82 - 96 (1931)

- 29 LOWE, J.S.:

Serum protein changes in rats in-
duced with mycobacterial adjuvant;
Biochem. Pharmacology 13,
633 - 641 (1964)

- 30 LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. u. RANDALL, R.J.
Protein Measurement with the Folin
Phenol Reagent L. Biol. Chem. 16,
265 - 275 (1951)

- 31 NEWBOULD, B.B.: Role of Lymph Nodes in Adjuvant-Induced Arthritis in Rats; Ann. of rheum. dis. 23, 392 - 396 (1964)
- 32 NOHL, M.: Untersuchungen zur Pathogenese der experimentellen Adjuvans-Arthritis der Ratte; Inaug. Dissertation Gießen 1969
- 33 PAULINI, K.: Zytophometrische DNS-Messungen nach einseitiger Nephrektomie; Virchows Arch. Path. Anat. Abt. B. 5, 79 - 100 (1970)
- 34 PEARSON, C.: Development of Arthritis, Periarthritis and Periostitis in Rats given Adjuvant; Proc. Soc. exp. Biol. 91, 99 (1956)
- 35 PEARSON, C. u. WOOD, F.D.: Studies of Polyarthritis and other Lesions Induced in Rats by Injection of Mycobacterial Adjuvant; I. General Clinical and Pathologic Characteristics and some Modifying Factors; Arthritis and Rheumatism 2, 440 - 459 (1959)
- 36 PEARSON, C., WAKSMAN, B.H. u. SHARP, J.T.: Studies of Arthritis and other Lesions induced in Rats by Injection of Mycobacterial Adjuvant V. Changes Affecting the Skin and Mucous Membranes. Comparison of the experimental Process with human disease J. exp. Med. 113, 485 - 509 (1960)
- 37 PEARSON, C. u. WOOD, F.D.: Passive Transfer of adjuvant arthritis by lymph node or spleen cells J. Exper. Med. 120, 547 - 560 (1964)
- 38 PEARSON, C. u. WOOD, F.D.: Studies of Arthritis and other Lesions induced in Rats by the Injection of Mycobacterial Adjuvant. VII. Pathologic Details of the Arthritis and Spondylitis Am. J. Pathology 42, 73 (1963)
- 39 RYZEWSKA, A.G.: Influence of lymphatic tissue on the development of Adjuvant-induced Polyarthritis in Rats; Ann. Rheum. Dis. 26, 506 (1967)

- 40 SCHMIDT, K. u. BENEKE, G.:
Untersuchungen zur Altersabhängigkeit der Adjuvans-Erkrankung der Ratte; Zeitschrift f. Gerontologie 4, 154 - 179 (1971)
- 41 SCHMITT, W. u. BENEKE, G.:
benschaltern
Untersuchungen der Bindegewebsproliferation in verschiedenen Lebensaltern. Virchows Arch. path. Anat. Abt. B 5, 351 - 364 (1970)
- 42 SCHMIDT, K., OTT, V.R., BOSMANSKY, K. u. POHL, J.:
Biochemische Untersuchungen bei der Adjuvanskrankheit der Ratte, z. Rheumaforsch. 31, 409 - 416 (1972)
- 43 SCHMIDT, F.H.:
Erfahrungen mit Enzymbestimmungen bei Toxizitätsuntersuchungen; Med. Forsch. Boehringer, Mannheim 1965
- 44 SHARP, J.T., WAKSMAN, B.H., PEARSON, C. u. MADOFF, S.:
Studies of Arthritis and other Lesions induced in Rats by Injection of Macobacterial Adjuvant IV. Examination of Tissue and Fluid for Infections Agents; 4, 169 - 175 (1961)
- 45 SILVERSTEIN, E.u. SOKOLOFF, L.:
Periarthritis produced in Rats with Freund's Adjuvans-Arthritis Rheuma. 3, 485 (1960)
- 46 SPLINTER, F.K. u. HOFFMANN, H.:
Biologische Normalwerte bei Wistar-Ratten (Jena) verschiedenen Alters. IV. Mitteilung: Gesamtprotein und Proteinmuster sowie Reststickstoffgehalt im Serum. Zeitschr. Versuchstierkunde 9, 298 - 305 (1964)
- 47 STOERK, H.C., BIELINSKI, L.C. u. BUDZILOVICH, T.:
Chronic polyarthrititis in rats injected with spleen in adjuvants. Am. J. Pathol. 30, 616 (1954)
- 48 TANZER, T.L. u. GILLVARG,
Creatine and Creatine Kinase Measurement; J. of Biolog. Chem. 234, 12 (1959)

- 49 VAUBEL, E.: Die Eiweißüberempfindlichkeit (Gewebshyperergie) des Bindegewebes (II. Teil) Experimentelle Untersuchungen zur Erzeugung des rheumatischen Gewebsschadens im Herzen und in den Gelenken; Beitr. path. Anat. 89, 375 - 418 (1932)
- 50 WAKSMAN, B.H., PEARSON, C.M. u. SHARP, J.T.: Studies of Arthritis and other Lesions induced in Rats by Injection of Mycobacterial Adjuvant; J. Immunolog. 85, 403 - 417 (1960)
- 51 WAKSMAN, B.H. u. WENNERSTEN, C.: Passive Transfer of Adjuvant Arthritis in rats with living lymphoid cells of sensitized donors; Int. Arch. Allergy 23, 129 - 139 (1963)
- 52 WARD, J.R. u. JONES, R.S.: Studies of Adjuvant-induced Polyarthritis in Rats I. Adjuvant-Composition, Route of Injection, an Removal of Depot Site; Arthritis and Rheumatism 5, 557 (1962)
- 53 WEIMER, H.E., WOOD, F.D. u. PEARSON, C.M.: Serum protein alterations in adjuvant-induced Arthritis Canadian J. of bioch. and physiol. 46, 743 - 748 (1968)

Lebenslauf: P o h l , Jürgen

Am 27.5.1946 wurde ich als drittes von fünf Kindern des Studienrates Martin Pohl und seiner Ehefrau Ursula geb. Mühr in Erfurt geboren.

1950 zogen wir nach Eschweiler, wo ich 1952 eingeschult wurde. Ein Jahr später wurde mein Vater nach Bitburg (Eifel) versetzt. Hier besuchte ich ein Jahr lang das Neusprachliche Gymnasium, wechselte dann aber auf das Humanistische Gymnasium, die Regino-Schule in Prüm (Eifel). Wegen weiterer Umzüge besuchte ich noch das Gymnasium auf der Amöneburg (Hessen), das Philippinum in Marburg und Landgraf-Ludwig-Gymnasium in Gießen, an dem ich im Februar 1966 das Abitur ablegte.

Ebenfalls in Gießen studierte ich Medizin bis zum Physikum im Herbst 1968 und wechselte dann für ein Semester nach Wien. Ab 1969 studierte ich wieder in Gießen und bestand hier am 6.1.1972 das Staatsexamen. Seit dem 1. Februar 1972 arbeite ich als Medizinal-Assistent an der Klinik und dem Institut für Physikalische Medizin und Balneologie der Universität Gießen in Bad Nauheim. Die chirurgische Pflichtzeit verbrachte ich von Juni bis September 1972 in der Hofgarten-Klinik Aschaffenburg und die restlichen vier Monate meiner Medizinalassistentenzeit in der Schloßbergklinik Oberstaufen. Hier blieb ich als Assistenzarzt bis zu meiner Einberufung zur Bundeswehr am 1.5.1973.

Lebenslauf: B a u m s t i e g e r , Peter

Am 14.5.47 wurde ich als zweiter Sohn des Feinmechanikermeisters Marcel Lucian Baumstieger und seiner Ehefrau Maria geb. Bernd in Gießen geboren.

Ostern 1953 wurde ich eingeschult. Nach vier Grundschuljahren besuchte ich von 1957 bis 1966 den neusprachlichen Zweig der Herderschule, eines Gymnasiums, in Gießen.

Nach bestandenem Abitur begann ich mein Medizinstudium an der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Im Frühjahr 1967 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab. Nach bestandener ärztlicher Vorprüfung im Herbst 1968 studierte ich im WS 68/69 an der Wiener Universität und kehrte zum SS 69 wieder nach Gießen zurück. Am 6.1.72 bestand ich das medizinische Staatsexamen.

Vom 1.2.72 bis zum 31.5.72 arbeitete ich als Medizinalassistent an der Klinik und dem Institut für Physikalische Medizin und Balneologie der Universität Gießen in Bad Nauheim, wo ich meine Dissertation abschloß. Am Richtig-Krankenhaus in Karlsruhe-Durlach leistete ich vom 1.6.72 bis zum 28.2.73 meine internistische und chirurgische Medizinalassistentenzeit ab und erhielt im März 1973 meine Approbation als Arzt. Seit dem 1.4.73 arbeite ich bei der Bundeswehr als Stabsarzt, um meine Wehrpflicht zu erfüllen.

Herzlichen Dank sagen wir Herrn Professor Dr. V. R. Ott,
der uns das Thema freundlicherweise überließ und uns
durch seine großzügige ideelle und finanzielle Förderung
das Arbeiten an seiner Klinik ermöglichte.

Vielen Dank Herrn Oberarzt Dr. med. K. Schmidt für die
umfassende Hilfe bei der Einführung in die Thematik und
Methodik der Arbeit sowie die selbstlose Unterstützung
bei der Ausführung der Versuche und der Abfassung der
Dissertation.

